

BIOMARCADORES EN LAS ENFERMEDADES PULMONARES INTERSTICIALES DIFUSAS



TESIS DOCTORAL
Eva Belén Cabrera César

Directores:
María Inmaculada García Fernández
Concepción Parrado Romero

**Departamento de Fisiología Humana, Histología Humana, Anatomía Patológica y
Educación Física Deportiva.**

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Departamento de Fisiología Humana, Histología Humana,
Anatomía Patológica y Educación Física Deportiva.
Facultad de Medicina. Universidad de Málaga

TESIS DOCTORAL



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

BIOMARCADORES EN LAS ENFERMEDADES PULMONARES INTERSTICIALES DIFUSAS

EVA BELÉN CABRERA CÉSAR

**DIRECTORES:
MARIA INMACULADA GARCÍA FERNÁNDEZ
CONCEPCIÓN PARRADO ROMERO**

MÁLAGA 2017

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Eva Belén Cabrera César

 <http://orcid.org/0000-0003-1288-7887>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





María Inmaculada García Fernández y Concepción Parrado Romero

HACEMOS CONSTAR que este trabajo, titulado “Biomarcadores en las Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas”, que presenta D^a Eva Belén Cabrera César, para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento Fisiología Humana, Histología Humana, Anatomía Patológica y Educación Física Deportiva de la Universidad de Málaga.

Málaga a 9 de Enero de 2017

Los directores de la tesis doctoral

Dra. María Inmaculada García Fernández

Dra. Concepción Parrado Romero

“Aunque estudiaras medicina durante más de una vida, acudiría a ti gente cuyas enfermedades son misterios, porque la angustia que mencionas es parte integrante de la profesión de curar y hay que aprender a vivir con ella. Aunque es verdad que cuanto mejor sea la preparación, mejor doctor puedes ser.”

NOAH GORDON

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer el tiempo que me ha dedicado, su gran trabajo, y generosidad a mi directora de tesis, la Dra. Concepción Parrado Romero.

A mi codirectora de tesis, la Dra. María Inmaculada García Fernández por su tiempo y el gran trabajo que ha realizado.

A la Dra. Francisca Rius, por su ayuda con el análisis estadístico.

Al Servicio de Neumología del Hospital Universitario Virgen de la Victoria, mis maestros, por animarme y darme los medios para llevar a cabo este trabajo y estar dispuestos a ayudarme siempre, especialmente a la Dra. M^a Carmen Fernández Aguirre, ha sido imprescindible para la realización de este trabajo y a la Dra. M^a Victoria Hidalgo Sanjuán, por trasmitirme su ilusión y hacer esta tesis posible.

A Lidia López López, compañera de aventura.

A mis amigas y familia por su apoyo continuo.

Especialmente agradecerles a mis padres, su dedicación y amor incondicional, todo es gracias a vosotros. A mis hermanos, mis mejores ejemplos. A Nacho, por creer en mí, por la suerte de tenerlo en esta etapa y en la vida.

A los pacientes, que colaboraron a pesar de sus limitaciones, con la esperanza en la investigación, a los que están y a los que no, gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	17
1. INTRODUCCIÓN	23
1.1. DEFINICIÓN.	1
1.2. EPIDEMIOLOGÍA.	2
1.3. ETIOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN.	4
1.4. CLÍNICA.	5
1.5. DIAGNÓSTICO.	8
1.6. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.	19
1.7. TRATAMIENTO.	20
1.8. TIPOS DE ENFERMEDAD PULMONAR INTERSTICIAL.	24
1.8.1. FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA:	24
1.8.2. NEUMONÍA INTERSTICIAL NO ESPECÍFICA:	30
1.8.3. ENFERMEDAD INTERSTICIAL SECUNDARIA A CONECTIVOPATÍA:	31
1.9. PATOGENIA.	33
1.9.1. GENERALIDADES:	33
1.9.2. EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA ENFERMEDAD PULMONAR INTERSTICIAL DIFUSA.	35
1.9.3. EPID Y LOS PRODUCTOS RESULTANTES DEL IMPACTO DE ROS.	37
1.9.4. EPID Y DEFENSA ANTIOXIDANTE.	43
1.9.5. MATRIZ EXTRACELULAR Y SU RELACIÓN CON EL ESTRÉS OXIDATIVO.	47
2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACION	49
3. MATERIAL Y MÉTODOS	53
3.1. POBLACIÓN A ESTUDIO.	55
3.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN.	55
3.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.	55
3.2.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.	56
3.3. RECOGIDA DE LAS MUESTRAS.	56
3.4. EVALUACIÓN DE LOS PRODUCTOS RESULTANTES DEL IMPACTO DE ROS.	57
3.4.1. EVALUACIÓN DE LOS AGE.	57
3.4.2. CUANTIFICACIÓN DE AOPP.	57
3.4.3. CUANTIFICACIÓN DE LOOH.	58
3.4.4. CUANTIFICACIÓN DE TBARS.	58
3.5. EVALUACIÓN DE LOS FACTORES ANTIOXIDANTES.	59
3.5.1. CUANTIFICACIÓN DE LOS TIOLES.	59
3.5.2. EVALUACIÓN DE TAS.	59
3.5.3. EVALUACIÓN DE EC-SOD.	59
3.5.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE EC-SOD.	60
3.5.5. EVALUACIÓN DE POLIMORFISMOS DE EC-SOD.	60
3.6. CUANTIFICACIÓN DE MMP 7.	61
3.7. ESTUDIO ESTADÍSTICO.	62
4. RESULTADOS	65
4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.	67
4.1.1. VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS.	67
4.1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.	68
4.1.3. VARIABLES DE FUNCIÓN RESPIRATORIA.	69
4.2. PRODUCTOS RESULTANTES DEL IMPACTO DE ROS.	70
4.2.1. PRODUCTOS RESULTANTES DEL IMPACTO DE ROS/RNS: AGES Y AOPP, DIFERENCIA ENTRE ENFERMOS DE EPID Y SANOS.	70
4.2.2. PRODUCTOS RESULTANTES DEL IMPACTO DE ROS: DIFERENCIAS ENTRE FPI Y EPID-CTD.	71

4.3. FACTORES ANTIOXIDANTES.	73
4.3.1. FACTORES ANTIOXIDANTES DIFERENCIAN ENTRE EPID Y SANOS.	73
4.3.2. FACTORES ANTIOXIDANTES. DIFERENCIAS ENTRE FPI Y EPID-CTD.	75
4.3.3. BALANCE FINAL ENTRE LOS PRODUCTOS RESULTANTES DE LA OXIDACIÓN/ANTIOXIDANTES. BALANCE INCREMENTADO EN LOS ENFERMOS DE EPID.	76
4.4. MMP-7 INCREMENTADA EN ENFERMOS DE EPID.	78
4.5. ANÁLISIS DE CURVAS ROC PARA DISCRIMINAR PACIENTES CON FPI Y EPID-CTD DE SANOS.	80
4.5.1. CURVA ROC Y AGES.	80
4.5.2. CURVA ROC Y AOPP.	81
4.5.3. CURVA ROC Y MMP-7.	82
4.6. RELACIÓN ENTRE LOS BIOMARCADORES SÉRICOS Y LA CLÍNICA DE LOS PACIENTES CON EPID.	83
4.6.1. FACTORES SÉRICOS Y FUNCIÓN PULMONAR.	84
4.6.2. FACTORES SÉRICOS Y EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD.	86
5. DISCUSIÓN	89
5.1. GENERALIDADES	91
5.2. PRODUCTOS RESULTANTES DEL IMPACTO DE LOS ROS. VALORES SÉRICOS EN FPI Y EPID-CTD.	94
5.2.1. NIVELES DE AGES SUPERIORES EN PACIENTES CON FPI Y EPID-CTD.	94
5.2.2. NIVELES DE AOPP AUMENTADOS EN LOS PACIENTES DE EPID.	96
5.2.3. LOS PRODUCTOS DE OXIDACIÓN DE LÍPIDOS NO ESTAN ELEVADOS EN LOS PACIENTES DE EPID.	97
5.3. ANITOXIDANTES Y EPID.	99
5.3.1. TIOLES TOTALES MÁS ALTOS EN PACIENTES QUE EN LOS INDIVIDUOS SANOS. TIOLES TOTALES Y TRATAMIENTO CON ACETILCISTEINA.	99
5.3.2. NIVELES DE EC-SOD AUMENTADOS EN SANGRE. POLIMORFISMO DE EC-SOD.	100
5.3.3. BALANCE FINAL ENTRE LOS PRODUCTOS RESULTANTES DE LA OXIDACIÓN/ANTIOXIDANTES. BALANCE INCREMENTADO EN LOS ENFERMOS DE EPID.	102
5.4. METALOPROTEASA 7 INCREMENTADA EN LOS PACIENTES DE EPID.	103
5.5. POSIBLES BIOMARCADORES DE EPID. AGE, AOPP Y MMP-7.	104
6. CONCLUSIONES	109
7. BIBLIOGRAFÍA	113

ABREVIATURAS:

ACC: Acetilcisteína.

AECs: células epiteliales alveolares.

AGE: productos finales de la glicación avanzada.

ALAT: Latin American Thoracic Association.

ANA: anticuerpos antinucleares.

ANCA: anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos.

AntiOX: antioxidantes.

AOPP: productos de la oxidación avanzada de las proteínas.

AR: artritis reumatoide.

ARE: elementos de respuesta antioxidante.

ATS: American Thoracic Society.

AU: unidades arbitrarias.

AUC: área bajo la curva.

BAL: lavado broncoalveolar.

BIR-EPID: Bronquilitis respiratoria asociada a enfermedad pulmonar intersticial.

CMV: citomegalovirus.

CTC: Corticoides.

CV: capacidad vital.

Cys: cisteína.

CySS: cistina.

DLCO: capacidad de difusión del monóxido de carbono.

EBV: virus de Epstein-Barr.

EC-SOD: isoforma extracelular de superóxido dismutasa.

ECA: enzima convertidora de angiotensina.

ECM: matriz extracelular.

EDTA: ácido etilendiaminetetraacético.

EMT: transición epitelio mesenquimatoso.

eNOS: sintetasa de óxido nítrico endotelial.

EPID-CTD: enfermedad pulmonar asociada a enfermedad del tejido conectivo.

EPID: enfermedad pulmonar intersticial difusa.

ERS: European Respiratory Society.

ESM: error estándar de la media.

FEPP: Fibroelastosis pleuroparenquimatosa idiopática.

FIG: Figura.

FPI: fibrosis pulmonar idiopática.
 FVC: capacidad vital forzada.
 GLY: glicina.
 GPX: glutatión peroxidasa.
 GSH: glutatión.
 H₂O₂: peróxido de hidrógeno.
 HOCl: ácido hipocloroso.
 HSA: albumina sérica.
 JRS: Japanese Respiratory Society.
 LOOH: hidroperóxidos lipídicos.
 MDA: malondialdehído.
 MMP-7: metaloproteínasa de la matriz 7.
 mMRC: escala de disnea modificada del Medical Research Council.
 MPO: mieloperoxidasa.
 NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
 NIA: neumonía intersticial aguda.
 NID: neumonía intersticial descamativa.
 NIL: neumonía intersticial linfocitaria idiopática.
 NINE: neumonía intersticial no específica.
 NIU: neumonía intersticial usual.
 NO: óxido nítrico.
 NOC: neumonía organizada criptogénica.
 O₂⁻: anión superóxido.
 OH⁻: radicales de hidroxilo.
 ONOO⁻: peroxinitrito altamente reactivo.
 OX: oxidantes.
 PBS: fosfato tampón.
 PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
 Prx: peroxirredoxinas.
 RAGE: receptor para el AGE.
 RD: radioterapia.
 RNS: especies reactivas del nitrógeno.
 ROC : *receiver operating characteristic curve*.
 ROS: especies reactivas del oxígeno.
 RPM: revoluciones por minuto.
 SOD: superóxido dismutasa.
 SP-A: proteína del surfactante A.

SP-B: proteína del surfactante B.

SP-C: proteína del surfactante C.

SP-D: proteína del surfactante D.

TACAR: tomografía axial computalizada de alta resolución.

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

TGF- β : factor de crecimiento transformante- β .

TIMP: inhibidor tisular de la metaloproteinasa.

TNF- α : factor de necrosis tumoral α .

RESUMEN

INTRODUCCION

Las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) representan un grupo heterogéneo de trastornos respiratorios, en su mayoría crónicos, asociados a una alta morbimortalidad. A pesar de múltiples ensayos e investigaciones siguen siendo un reto por su dificultad diagnóstica y su manejo terapéutico.

La identificación de biomarcadores en suero que tengan valor diagnóstico y pronóstico es de gran importancia, particularmente en los casos en los que las pruebas diagnósticas no son totalmente concluyentes para la filiación de la enfermedad.

La fibrosis, característica de éstos procesos, se asocia a un desequilibrio redox y al estrés oxidativo, por lo que actualmente se hace hincapié en la importancia de los biomarcadores del estrés oxidativo en diferentes patologías incluyendo la patología fibrótica pulmonar.

El objetivo de nuestro estudio es determinar la validez de los niveles séricos de los factores derivados del daño oxidativo y de las defensas antioxidantes, como biomarcadores en la enfermedad pulmonar intersticial difusa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han seleccionado 55 pacientes diagnosticados de EPID según los criterios de la ATS/ERS/JRS/ALAT y se han comparado con 30 sujetos sanos. Los pacientes realizaban seguimiento en la consulta monográfica de enfermedades pulmonares intersticiales del Servicio de Neumología del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga, entre octubre del 2010 y junio del 2015.

A todos los sujetos motivos de estudio se les midieron en sangre periférica, por un lado los productos resultantes del impacto de ROS como productos finales de la glicación avanzada (AGE), productos de la oxidación avanzada de las proteínas (AOPP), hidroperóxidos de lípidos (LOOH) y, las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), y por otro los factores que representan las defensas antioxidantes como la concentración másica de la de la superóxido dismutasa extracelular (EC-SOD en ng/mL), la actividad enzimática de EC-SOD (U/mL), Tioles Totales y actividad total antioxidante (TAS). Igualmente se valoró la concentración de MMP-7. Se valoraron

finalmente los polimorfismos de EC-SOD. Se evaluaron, en estos marcadores, no solo su capacidad de discriminar entre sanos y enfermos, sino su capacidad de discernir entre las diferentes patologías y su valor pronóstico.

RESULTADOS

De los 55 pacientes, 29 de ellos habían sido diagnosticados de fibrosis pulmonar idiopática (FPI), 12 sujetos tenían enfermedad pulmonar intersticial no específica (NINE) y 14 sujetos enfermedad pulmonar secundaria a conectivopatía (EPID-CTD).

Al analizar los factores resultantes del estrés oxidativo se obtuvieron niveles en sangre periférica en el grupo de enfermos significativamente superiores a los sanos para AGES ($P \leq 0,002$) y para AOPP ($P \leq 0,004$). No se han encontrado diferencias significativas en LOOH y TBARS entre enfermos de EPID y sanos.

Los niveles obtenidos para los factores antioxidantes son significativamente mayores en los enfermos que en los sanos, excepto para la actividad enzimática EC-SOD (U/mL). Los pacientes no presentaron polimorfismo Arg213Gly (rs 8192291) de EC-SOD.

Se evaluó el equilibrio redox mediante la relación oxidantes/antioxidantes (relación OX/AntiOX) observándose un cociente mayor en EPID ($P \leq 0,01$), que supone una menor capacidad antioxidante en los enfermos.

Se observaron niveles en sangre periférica más elevados MMP-7 en enfermos ($P < 0,0001$).

Se comprobaron las diferencias que existían entre los pacientes de FPI y EPID-CTD. Se excluyeron en la valoración del diagnóstico diferencial los pacientes con NINE. AGES fue el único marcador que pudo diferenciar entre los pacientes con FPI y pacientes con EPID-CTD. Los pacientes EPID-CTD tenían valores más altos (incremento de 43.59 %) que los que padecían FPI ($P \leq 0,038$). Los pacientes con FPI seguían teniendo valores significativamente más altos que los controles ($P \leq 0,03$).

El análisis de las curvas ROC en los enfermos de EPID-CTD mostró las AUC para AGES y MMP-7 de 0,95 y 1 respectivamente. Para los pacientes con FPI las AUC fueron para AGES y MMP-7 de 0,78 y 0,95. AOPP solo presentó un AUC mayor del 0,7 para FPI (0,80).

No se encontró ninguna relación entre la función respiratoria ni la evolución de los pacientes con los productos de la oxidación y/o las defensas antioxidantes.

CONCLUSIONES

Todos los factores resultantes del estrés oxidativo, estudiados en los pacientes con EPID, se encuentran aumentados en sangre periférica al compararlos con los individuos sanos, con la excepción de LOOH y TBARS.

De los productos derivados del estrés oxidativo elevados en las EPID, AGEs podría considerarse un biomarcador para el diagnóstico diferencial entre FPI y EPID-CTD, algo relevante en estas patologías con solapamiento clínico. En el caso de AOPP solo se podría valorar su uso para el diagnóstico de FPI. MMP-7 sería un excelente biomarcador diagnóstico para FPI y EPID-CTD por su alta sensibilidad y especificidad en ambas patologías, sin que se pueda considerar su uso en el diagnóstico diferencial de ambas patologías, como ocurre con los AGEs.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DEFINICIÓN.

Las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) constituyen un grupo heterogéneo de más de 300 enfermedades con manifestaciones clínicas, radiológicas y pruebas funcionales respiratorias similares (1-3), caracterizadas por la inflamación y la fibrosis a nivel pulmonar, con una alteración anatomopatológica común que afecta a las estructuras alveolo intersticiales. El término EPID no describe en realidad el sustrato anatomopatológico de dichas entidades clínicas, puesto que éstas afectan también, en muchas ocasiones, las pequeñas vías respiratorias, así como la vasculatura pulmonar (4).

Las EPID representan un 15% de la patología pulmonar. Entre las más frecuentes se encuentran la sarcoidosis (5,6), la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), la enfermedad pulmonar asociada a enfermedad del tejido conectivo (EPID-CTD del inglés *connective tissue disease*) como la artritis reumatoide o la esclerodermia (7,8), la alveolitis alérgicas extrínsecas, la enfermedad pulmonar intersticial inducida por fármacos y la neumoconiosis. Algunas de estas enfermedades tales como la sarcoidosis y la EPID-CTD, también pueden afectar a otros órganos (7).

Su rápida detección y tratamiento puede prevenir la progresión hacia estadios más avanzados de la enfermedad, favoreciendo su pronóstico.

En los últimos años se han realizado un gran número de estudios sobre las enfermedades pulmonares intersticiales desarrollándose grandes ensayos controlados aleatorizados con nuevos tratamientos que pretenden cambiar las perspectivas de los pacientes. Además, se están estudiando nuevos datos sobre los mecanismos básicos de la enfermedad buscando aumentar la precisión diagnóstica.

Este auge en la literatura y la investigación sobre el diagnóstico y el manejo de las EPID demuestra que se han convertido en un tema de actualidad, del que quedan importantes aspectos por conocer.

1.2. EPIDEMIOLOGÍA.

Es difícil conocer la epidemiología de las EPID. Según los estudios publicados, su incidencia y prevalencia es variada (9). Obtener estos datos se ve dificultado por la diferente metodología seguida para realizar los registros y por la aparición de nuevas clasificaciones que impiden cuantificar con certeza las cifras de nuevas entidades clínicas. Otro inconveniente es que los registros se basan en los datos de los servicios de neumología, excluyendo los sujetos diagnosticados en otras unidades.

Las EPID más frecuentes son la fibrosis pulmonar idiopática y la sarcoidosis seguidas por las alveolitis alérgicas extrínsecas y las asociadas a la enfermedad del colágeno (10). Existen estudios que sugieren que la FPI supone de un 17 al 37% de todas las EPID (11).

En España la prevalencia de EPID se estima en 7,6 casos/100.000 habitantes, siendo la más frecuente la FPI. Estos datos son superponibles a los obtenidos en Andalucía (9), en Madrid (10) y en estudios europeos (12) (Tabla I). En este último se muestran diferencias en cuanto a la EPID más frecuente respecto a otros países. La sarcoidosis es la enfermedad más frecuente en países como Bélgica, Alemania, Italia y Grecia, si bien no son comparables los periodos de tiempo estudiados.

Epidemiología de	las EPID	en España.	
	RENIA Andalucía (1998-2000)	EPID- Neumomadrid (2005-06)	Registro SEPAR (2000-01)
Nº pacientes	744	105	511
Incidencia EPID	7,2/100.000	3/100.000	7,6/100.000
Desconocidas			
Sarcoidosis	87 (12%)	16 (15,3%)	76 (15%)
Neum. Idiopática	287(39%)	46(43,8%)	215 (42%)
NINE	38 (5,1%)	8 (7,6%)	53 (10%)
Conectivopatía	69 (9,3%)	4 (3,8%)	51 (19%)
Histiocitosis X	6 (8%)	2 (1,9%)	15 (3%)
Conocidas			
Neumonitis por	38 (5,1%)	1 (1,9%)	34 (7%)
hipersensibilidad			21 (4%)
Fármacos +RD*		4 (3,8%)	
Neumoconiosis	55 (7,4%)	7 (6,6%)	No registrada
Otras	95 (12,8%)	8 (7,6%)	46 (9%)

Tabla I Tabla modificada de Jareño et al. 2008 sobre la incidencia de las EPID en España

*RD: Radioterapia

Cuando los datos se han estratificado por sexo y edad, la mayoría de los estudios han mostrado mayores tasas de prevalencia e incidencia entre los hombres de mayor edad, especialmente a partir de los 75 años (13). Los pacientes con FPI tienen por lo general entre 40 y 70 años. Dos tercios de los casos de FPI se presentan en pacientes mayores de 60 años, con una edad media de 66 años en el momento del diagnóstico (14), siendo poco frecuente su diagnóstico en menores de 40 años.

Se prevé una prevalencia creciente y una incidencia estable o en aumento de la FPI en los países occidentales, atribuyéndose ésta a una mejora en las técnicas diagnósticas, mayor sensibilidad de los profesionales y al envejecimiento poblacional

entre otros.

1.3. ETIOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN.

En el 2002 la American Thoracic Society (ATS) y la European Respiratory Society (ERS)(15) elaboraron un consenso, en el que las enfermedades pulmonares intersticiales quedaban clasificadas en cuatro grupos :

- **EPID de causa conocida o asociadas a otras entidades clínicas bien definidas.** Entre las que se incluyen las manifestaciones pulmonares secundarias a conectivopatías, por fármacos (Amiodarona), radioterapia, neumonitis por hipersensibilidad a polvos orgánicos (alveolitis alérgicas extrínsecas) o polvos inorgánicos (neumoconiosis) y las asociadas a enfermedades hereditarias.

- **Neumonías intersticiales idiopáticas**, que engloba la fibrosis pulmonar idiopática y otros grupos donde se encuentra la neumonitis descamativa, la neumonitis intersticial aguda, la neumonía intersticial no específica, la neumonía organizada criptogenética, la bronquiolitis respiratoria y la neumonía intersticial linfocítica.

- **Enfermedades granulomatosas** como la sarcoidosis o las secundarias a micobacterias y a hongos.

- **Otras** formas de enfermedades intersticiales como la linfagiliomiotosis, la histiocitosis de células de Langerhans, la proteinosis alveolar, la microlitiasis alveolar, la eosinofilia pulmonares, la amiloidosis y las EPID no clasificadas.

Esta clasificación fue modificada posteriormente en el 2013 (16) y en el grupo de las neumonías intersticiales idiopáticas quedan establecidos tres grupos:

-Neumonías intersticiales idiopáticas mayores:

- Fibrosis pulmonar idiopática (FPI).
- Neumonía intersticial aguda (NIA).
- Neumonía intersticial no específica (NINE).
- Bronquilitis respiratoria asociada a enfermedad pulmonar intersticial (BIR-EPID).
- Neumonía intersticial descamativa (NID).
- Neumonía organizada criptogenética (NOC).

-Neumonías intersticiales idiopáticas raras:

- Neumonía intersticial linfocítica idiopática (NIL).
- Fibroelastosis pleuroparenquimatosa idiopática (FEPI).

-Neumonías intersticiales clasificables.

1.4. CLÍNICA.

Las EPID no tienen una presentación clínica típica, sino que incluyen síntomas respiratorios inespecíficos. Los pacientes suelen tener disnea y tos crónica (17).

El curso clínico de la enfermedad es variable, existiendo formas de presentación aguda, subagudas o crónicas. La clínica de las neumonías intersticiales idiopáticas y las EPID-CTD son similares(18).

Generalmente los síntomas preceden al diagnóstico aproximadamente de uno o dos años (19) e incluso los cambios radiográficos pueden preceder a los síntomas, lo que sugiere periodos subclínicos de la enfermedad.

➤ Síntomas frecuentes:

La disnea de esfuerzo y la tos son los síntomas más frecuentes, siendo el síntoma cardinal la aparición de disnea progresiva, que suele asociarse a alteraciones en la

Introducción

radiografía de tórax. Cuando éste es el único síntoma que presenta el paciente se produce una demora en el diagnóstico por la dificultad que ello conlleva. En la fibrosis pulmonar idiopática la disnea puede tener un valor pronóstico, relacionándose con la calidad de vida y la supervivencia (14).

Se debe cuantificar de forma objetiva el grado de disnea. Para ello existen escalas, como la escala modificada del Medical Research Council (mMRC) (20) (Tabla II).

Escala modificada de la Medical Research Council.

- 0: disnea sólo ante actividad física muy intensa.
- 1: disnea al andar muy rápido o al subir una cuesta poco pronunciada.
- 2: incapacidad de andar al mismo paso que otras personas de la misma edad.
- 3: disnea que obliga a parar antes de los 100 m, a pesar de caminar a su paso y en terreno llano.
- 4: disnea al realizar mínimos esfuerzos de la actividad diaria como vestirse o que impiden al paciente salir de su domicilio.

Tabla II. Escala modificada de la Medical Research Council (escala mMRC).

Las manifestaciones clínicas pueden aparecer de forma más precoz o tardía dependiendo de la existencia de enfermedades concomitantes. En los sujetos ancianos o con discapacidad, con una vida limitada, las manifestaciones de la enfermedad pueden verse retrasadas.

La tos seca también es muy frecuente, suponiendo un impacto en la calidad de vida del paciente. Aparece en más del 80% de los sujetos diagnosticados de FPI (21). En ocasiones, la presencia de tos persistente tras una infección respiratoria es el síntoma inicial.

Introducción

➤ Síntomas menos frecuentes:

Existen síntomas menos frecuentes como las sibilancias, en relación a un proceso centrado en las vías respiratorias como la neumonitis por hipersensibilidad, neumonía eosinofílica o la sarcoidosis.

El dolor pleurítico puede ser un síntoma de los pacientes con sarcoidosis. Los sujetos con enfermedad del tejido conectivo pueden presentar serositis, o neumotórax en las enfermedades pulmonares quísticas tales como la linfangioleiomiomatosis (LAM) e histiocitosis de células de Langerhans (LCH)(22). La hemoptisis puede sugerir hemorragia alveolar difusa, a pesar de que no está presente en la mayoría casos(23). La neumoconiosis del minero de carbón puede presentar melanoptisis.

Las EPID relacionadas con las enfermedades del tejido conectivo pueden tener síntomas sistémicos inespecíficos tales como la sudoración nocturna, la fiebre, la fatiga y la pérdida de peso que sugieren la existencia de un estado inflamatorio subyacente.

En particular artralgias, rigidez matutina, hinchazón, eritema y deformidades en las articulaciones ponen en evidencia un trastorno inflamatorio subyacente, tipo artritis reumatoide, síndrome de Sjögren o la mezcla de trastornos del tejido conectivo.

En los casos de enfermedad pulmonar fibrótica avanzada existe hipoxemia, edemas en miembros inferiores, síncope, o dolor torácico como manifestación clínica de la hipertensión pulmonar severa y el cor pulmonale.

➤ Evolución:

El curso clínico de las EPID es muy variable. Varios estudios han señalado que la mortalidad relacionada con la FPI es mayor en los hombres, aumentando con la edad y parece aumentar con el tiempo. Olson (24) estudió las muertes relacionadas con la FPI en los EE.UU. entre 1992 y 2003, calculando una mortalidad ajustada por edad y sexo de 50,8 por 100.000/año, con una tasa de incremento del 28,4% para los hombres y 41,3% para las mujeres durante el período de estudio. Las razones detrás del incremento observado en la mortalidad de la FPI no son totalmente claras, aunque puede deberse a la mejora en el diagnóstico, más que a un aumento real de la mortalidad.

Introducción

Las exacerbaciones se asocian a un incremento de la mortalidad, especialmente en pacientes con FPI e hipertensión pulmonar asociada.

En cuanto a las causas de muerte por FPI, la insuficiencia respiratoria representa el 60% de las muertes seguido de las enfermedades cardiovasculares (8,5%) y del cáncer de pulmón (2,9%).

1.5. DIAGNÓSTICO.

El proceso diagnóstico debe integrar la sospecha clínica, una anamnesis completa, la exploración física, pruebas de imagen y un estudio anatomopatológico. Se trata de un proceso dinámico, en el que para alcanzar un diagnóstico definitivo es necesario la participación de un equipo multidisciplinar compuesto por neumólogos, radiólogos y anatomopatólogos expertos (25).

Debido al curso progresivo, la aparición tardía de los síntomas y la poca especificidad de los signos clínicos y fisiológicos, el diagnóstico de las enfermedades intersticiales se ve con frecuencia retrasado. Para la FPI se estima una duración media entre la aparición de los síntomas y el diagnóstico de más de 24 meses (26). El retraso en la derivación de los pacientes a un centro de atención terciaria especializada en EPID se ha relacionado con una peor supervivencia, por lo que el diagnóstico de FPI se convierte en urgente.

El proceso diagnóstico debe incluir:

ANAMNESIS:

La historia clínica debe recoger los siguientes datos:

-Edad y sexo: en función de la edad son más frecuentes unas EPID que otras. Entre los 20 y 40 años son habituales la sarcoidosis, la histiocitosis X, las EPID-CTD y la linfangioleiomiomatosis. Sin embargo, la FPI suele presentarse en sujetos mayores de 50 años. El sexo femenino es típico de la linfangioleiomiomatosis y las enfermedades del colágeno.

-Antecedentes familiares: la fibrosis pulmonar familiar, la microlitiasis alveolar, la esclerosis tuberosa, la neurofibromatosis y la sarcoidosis son entidades clínicas con historia hereditaria.

-Hábito tabáquico: Algunas EPID son propias de fumadores, como la neumonía intersticial descamativa (NID), la bronquiolitis respiratoria y la histiocitosis X. Lo contrario sucede en la sarcoidosis y las alveolitis alérgicas extrínsecas.

-Historia ocupacional y laboral: Debe interrogarse la exposición a agentes orgánicos e inorgánicos. La anamnesis laboral debe incluir las actividades laborales incluyendo la presencia de polvo inorgánico, así como la fecha en la que tuvo lugar la exposición y la duración de ésta.

-Fármacos y radioterapia: los fármacos y la radioterapia son causa frecuente de EPID.

-Enfermedades sistémicas: se debe conocer la presencia de comorbilidades tales como enfermedades del tejido conectivo o el virus de la inmunodeficiencia humana. Puede verse una afectación sistémica en las enfermedades pulmonares intersticiales difusas(27).

EXPLORACIÓN FÍSICA:

El dato clave en la exploración física es la auscultación. La mayoría de los pacientes con enfermedad intersticiales presentan crepitantes bibasales en “velcro”. Algunos además tienen acropaquias en el momento del diagnóstico.

La auscultación patológica en los lóbulos superiores puede orientar al diagnóstico de silicosis y sarcoidosis, en contraste con la auscultación de crepitantes en los lóbulos inferiores en los casos de FPI. En patologías como la alveolitis alérgica extrínseca y las eosinofiliyas pulmonares pueden auscultarse sibilancias.

Introducción

Conjuntamente puede haber manifestaciones de hipertensión pulmonar y de insuficiencia cardiaca en los casos de enfermedad avanzada, con un refuerzo del segundo tono cardiaco, ingurgitación yugular y edemas en miembros inferiores.

Cuando coexiste enfermedad del tejido conectivo pueden tener manifestaciones extrapulmonares con clínica dermatológica como erupciones en la piel, úlceras digitales "manos de mecánico" o manifestaciones a nivel del aparato locomotor como sinovitis o deformidades de las articulaciones. El fenómeno de Raynaud y las telangiectasias ayudan al diagnóstico diferencial.

Hallazgos como neurofibromas cutáneos o manchas de color café con leche en la neurofibromatosis y albinismo en el síndrome de Hermansky-Pudlak pueden ser la clave para el diagnóstico a través de un cuidadoso examen físico y una búsqueda dirigida.

ANÁLISIS SANGUÍNEOS:

Uno de los objetivos de las pruebas de laboratorio es descartar una enfermedad del tejido conectivo subyacente, junto con una completa anamnesis y un exhaustivo examen clínico. Las directrices de la British Thoracic Society (28) recomiendan un hemograma completo con recuento leucocitario, pruebas de función renal, electrolitos, pruebas de función hepática y análisis de orina. Otras pruebas que incluyen son un estudio de autoinmunidad con anticuerpos antinucleares (ANA), anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos (ANCA), velocidad de sedimentación globular, enzima convertidora de angiotensina (ECA), recolección de orina en 24 horas y las inmunoglobulinas (1,29).

Se ha destacado el papel de los ANCA en la (1,29) fibrosis pulmonar, con una mejor supervivencia en el grupo con bajos niveles de ANCA frente a los que presentaban un título alto, lo que justifica su determinación rutinaria (30-32).

En ocasiones, la afectación pulmonar es la (30-32) primera manifestación de las EPID-CTD, pudiendo incluso anteceder cinco años a la enfermedad (33), por lo que en aquellos pacientes en los que se sospecha la existencia de una enfermedad secundaria del tejido conectivo se recomienda la determinación de un grupo ampliado de anticuerpos tales como anticuerpos antipeptidos citrulinados cíclicos, (34,35),

Introducción

anticuerpos antitopoisomerasa I (Scl-70), anticuerpos anti-DNA de doble cadena, anti-RNP, anti-Smith (36), anti-tRNA sintetasa y entre ellos, el más común tipificado en las EPID, el anticuerpo anti-histidil-tRNA sintetasa o anti-Jo-1 (37,38). Otros anticuerpos anti-tRNA sintetasa han sido menos estudiados (37,38) como anti-PL-7, PL-12, EJ, KS, OJ, YRS, Zo(39,40).

Los niveles plasmáticos de la ECA se utilizan en el diagnóstico de la sarcoidosis (39,40), sin embargo puede estar elevados en otras EPID, debido a las acciones conocidas de la angiotensina II sobre las células del parénquima pulmonar, por tanto hay que ser cautos en su interpretación(41).

Otras determinaciones deberían realizarse de forma rutinaria, como los antígenos responsables de la alveolitis alérgica extrínseca en nuestra región (por ejemplo, la paloma y el *Aspergillus fumigatus*) y serologías para el virus de la hepatitis C y el virus de la hepatitis B.

En inmunodeprimidos, el citomegalovirus (CMV) y el virus de Epstein-Barr (EBV) son causa de neumonitis intersticial (42). El diagnóstico se basa en la detección de anticuerpos anti-CMV, reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) en tiempo real, y la formación de imágenes o pruebas histopatológicas. Del mismo modo, el diagnóstico de la neumonitis por EBV se basa en las manifestaciones clínicas en combinación con el patrón de anticuerpos serológicos (43).

En las últimas décadas ha habido una búsqueda de diferentes marcadores séricos que puedan estimar un diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Se ha descrito el antígeno KL-6, las metaloproteinasas (MMP), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) o las proteínas A y D del surfactante (SP-A y SP-D) (44) sin embargo, por el momento no se tienen suficientes estudios para poder aplicarlos a la práctica clínica habitual.

PRUEBAS DE IMAGEN:

-Radiografía de tórax: la radiología de tórax es fundamental en el estudio de las EPID. Es una técnica accesible, económica y su dosis de radiación es aceptable. Constituye el paso inicial en el proceso diagnóstico de las enfermedades intersticiales y en su seguimiento, ya que la comparación de los hallazgos radiológicos permite

Introducción

valorar la progresión y la gravedad del proceso. Radiológicamente, el patrón intersticial se caracteriza por imágenes lineales y nodulillares de distribución bilateral y difusa. Las enfermedades intersticiales en radiografía de tórax son difíciles de valorar, no coincidiendo en el mismo diagnóstico por distintos observadores hasta en el 30% de los casos. La mayoría de los pacientes presentan alteraciones radiológicas en el momento del diagnóstico y en función de la localización del patrón alterado contribuye a la orientación diagnóstica (Tabla III).

Los patrones radiológicos típicos son: vidrio deslustrado, nodulillar, reticular, reticulonodulillar y pulmón en panal de abeja, que suelen afectar a ambos hemitórax y se acompaña de pérdida de volumen pulmonar.

La NIA, NINE, NID, NOC, NIL, proteinosis alveolar, alveolitis alérgicas extrínsecas y las eosinofiliías pulmonares pueden cursar con un patrón alveolar.

Afectación predominante de los campos pulmonares inferiores:
<ul style="list-style-type: none"> -Fibrosis pulmonar idiopática. -EPID asociadas a enfermedades del colágeno. -Neumonía intersticial no específica. -Asbestosis.
Afectación predominante de los campos pulmonares superiores:
<ul style="list-style-type: none"> -Silicosis. -Alveolitis alérgicas extrínsecas. -Sarcoidosis. -Histiocitosis X. -Neumonía eosinófila.
Adenopatías hiliares o mediastínicas:
<ul style="list-style-type: none"> -Frecuentes: sarcoidosis. -Infrecuentes: neumonía intersticial linfocítica, amiloidosis.
Calcificadas en cáscara de huevo: silicosis, sarcoidosis.
Derrame y/o engrosamiento pleural:
<ul style="list-style-type: none"> -Linfangioleiomiomatosis. -Neumonitis por fármacos (nitrofurantoína). -Sarcoidosis. -Neumonitis por radioterapia. -Enfermedades del colágeno (excluyendo la dermatomiositis). -Asbestosis (engrosamientos y placas pleurales, derrame pleural).
Tamaño de los campos pulmonares normal o aumentado:
<ul style="list-style-type: none"> -Histiocitosis X. -Linfangioleiomiomatosis. -Enfisema pulmonar asociado. -Sarcoidosis. -Alveolitis alérgicas extrínsecas. -Neurofibromatosis. -Líneas B de Kerley.
Líneas B de Kerley: Linfangioleiomiomatosis.
Neumotórax: Histiocitosis X, Linfangioleiomiomatosis.
Calcinosis subcutánea: Esclerosis sistémica. Dermatomiositis.

Tabla III. Alteraciones de la radiografía de tórax en las EPID. Tabla modificada de Xaubet sobre el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades intersticiales difusas. (27)

La detección de un patrón intersticial en un estudio radiológico simple debe ser confirmada mediante una tomografía axial computarizada de alta resolución (TACAR).

-Tomografía axial computarizada de alta resolución: la TACAR es el método de imagen de elección en la evaluación y el diagnóstico de las EPID, ya que confirma la presencia de patología pulmonar, mostrando el intersticio alterado incluso en pacientes con radiografías de tórax normal. Además, establece el correcto diagnóstico de las complicaciones asociadas. Está indicado en los sujetos en los que se sospeche una patología intersticial, debiendo ésta ser interpretado por un radiólogo experto. Actualmente se aboga por un diagnóstico menos invasivos, siendo la TACAR clave para la aproximación diagnóstica.

Mediante TACAR, las lesiones intersticiales se agrupan en 5 patrones básicos (45):

-Patrón lineal-reticular: se debe al engrosamiento intersticial a nivel de los septos interlobulares o intralobulares. El engrosamiento de los septos interlobulares de localización central produce imágenes lineales de varios centímetros de longitud. Los septos localizados en la periferia y perpendiculares a la superficie pleural dan lugar a las llamadas líneas B de Kerley. En cuanto al engrosamiento intersticial intralobular se caracteriza por la presencia de una fina trama reticular que se extiende desde las estructuras peribroncovasculares del centro del lobulillo hasta los septos interlobulares, con una morfología “en tela de araña”. El patrón reticular y las bronquiectasias de tracción pueden ser reversibles tras un tratamiento apropiado.

-Patrón nodular: Los nódulos pueden ser de pequeño tamaño (> 2 mm) o miliares (1-2 mm). Siendo frecuentes en la sarcoidosis, la tuberculosis, la silicosis y la histiocitosis de células de Langerhans, así como en pacientes con metástasis.

-Patrón en “vidrio deslustrado”: es un tenue aumento de la densidad pulmonar de distribución a menudo geográfica, que no borra las estructuras vasculares adyacentes. En la enfermedad intersticial es visible cuando existe engrosamiento de los septos interlobulares o un grado mínimo de fibrosis. El patrón de vidrio deslustrado supone inflamación activa que en la mayoría de los casos es potencialmente reversible.

Introducción

-Patrón quístico: se caracteriza por la existencia de imágenes redondeadas de paredes finas (generalmente de 1 a 3 mm de grosor), bien definidas y con aire en su interior.

-Patrón de condensación o consolidación: se caracteriza por un aumento de la atenuación pulmonar asociado a un borramiento del contorno de los vasos adyacentes; en ocasiones puede identificarse la presencia de broncograma aéreo.

En función de la extensión de las lesiones parenquimatosas y de su naturaleza podemos hacer el diagnóstico diferencial entre las diferentes EPID (Tabla IV), por lo que en más de un 50% de los casos las imágenes pueden ser suficientemente características para permitir un diagnóstico seguro y eliminar la necesidad de pruebas más invasivas como la biopsia pulmonar quirúrgica (46) .

En los casos de fibrosis pulmonar idiopática se puede establecer el diagnóstico definitivo en función de los hallazgos de la TACAR, siempre que ésta sea interpretada por radiólogos expertos, que establecerán varias posibilidades: alta posibilidad de FPI, posible o imposible (47)(desarrollado en el apartado fibrosis pulmonar idiopática). Los signos de fibrosis pulmonar en la TACAR incluyen: patrón reticular, panalización, distorsión de las estructuras broncovasculares, bronquiectasias y bronquiolectasias de tracción. La panalización es la única situación irreversible.

La TACAR también puede ayudar al diagnóstico de la sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, linfangioleiomiomatosis, la histiocitosis de células de Langerhans, y proteinosis alveolar pulmonar, y puede seleccionar a aquellos pacientes que no requieren una biopsia pulmonar para su diagnóstico.

Neumonías intersticiales idiopáticas	Claves en las pruebas de imagen
Fibrosis pulmonar idiopática	-Fibrosis densa con remodelación de la arquitectura pulmonar y frecuente panalización. -Predominio subpleural y basal. -Heterogeneidad temporal en las lesiones.
Neumonía intersticial no específica	-Infiltrado intersticial difuso de las áreas afectadas. -Opacidades en vidrio deslustrado, reticular y bronquiectasias de tracción de distribución periférica o peribroncovascular y predominio basal.
Bronquiolitis respiratoria asociada a enfermedad intersticial	-Vidrio deslustrado y micronodulos centrolobulillares de predominio en los lóbulos superiores.
Neumonía descamativa	-Afectación uniforme del parénquima pulmonar -Engrosamiento de ligero a moderado de los septos alveolares. -Vidrio deslustrado periférico asociado a pequeños quistes bien definidos.
Neumonía organizada criptogénica	-Consolidaciones parcheadas y migratorias a menudo subpleurales con vidrio deslustrado.
Neumonía intersticial aguda	-Opacidades en vidrio deslustrado y consolidaciones de distribución geométrica (fase aguda) progresando a la distorsión con bronquiectasias de tracción (fase crónica).
Neumonía intersticial linfoide idiopática.	-Vidrio deslustrado y quistes peribroncovasculares.

Tabla IV. Aspectos claves en la tomografía axial computarizada de alta resolución (TACAR) en las neumonías intersticiales idiopáticas.

PRUEBAS FUNCIONALES RESPIRATORIAS:

Las recomendaciones internacionales (48) sobre el diagnóstico y el seguimiento de la FPI destacan la importancia del estudio de la función pulmonar en el diagnóstico,

Introducción

pronóstico, evolución y respuesta al tratamiento. Constituyen la traducción de la desestructuración del parénquima pulmonar.

La capacidad de difusión del monóxido de carbono (DLCO) debe ser estudiada en los pacientes con enfermedad pulmonar intersticial. Se encuentra disminuida debido a un engrosamiento de la barrera alveolocapilar que altera el intercambio gaseoso siendo uno de los indicadores más sensibles de las EPID. La Kco (cociente DLCO /volumen alveolar) suele ser normal o moderadamente baja. En los pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, la determinación seriada de la DLCO es un instrumento útil para estimar el pronóstico de la enfermedad. Un descenso debe hacer plantear la necesidad de la derivación del paciente para la valoración de trasplante pulmonar; se consideran clínicamente importantes cambios del 15% entre exploraciones (49).

Las pruebas de función respiratoria en la fibrosis pulmonar muestran una alteración ventilatoria restrictiva con disminución de los volúmenes pulmonares. En los pacientes con FPI, una caída en la capacidad vital forzada (FVC) mayor del 10% se considera clínicamente significativa y se asocia con un aumento de 2,4 veces el riesgo de mortalidad (50).

Los volúmenes respiratorios pueden ser normales o presentar un patrón obstructivo en la bronquiolitis respiratoria asociada a enfermedad pulmonar intersticial, la histiocitosis de células de Langerhans y la linfangioleiomiomatosis.

Los ensayos clínicos más recientes para la introducción de nuevos fármacos, convierten a la FVC y a la DLCO en las variables principales para comprobar su eficacia clínica.

La gasometría arterial muestra un aumento del gradiente alveoloarterial de O₂ (A-aO₂) con moderada hipocapnia. En fases avanzadas de la enfermedad aparecerá hipoxemia arterial con hipercapnia(51).

TEST DE LOS SEIS MINUTOS MARCHA:

El test de la marcha mide la distancia total recorrida durante seis minutos, registrando la saturación de oxígeno antes, durante y después del ejercicio. Algunos autores

defienden que es uno de los parámetros que mejor refleja la evolución y progresión del paciente(52).

Se considera que una disminución de 24 a 45 metros representa un aumento del riesgo de mortalidad (53) y es un valor útil para evaluar el estado de la enfermedad. Permite a su vez clasificar grupos de riesgo predictores de mortalidad, más frecuentemente en pacientes con baja DLCO y enfisema concomitante(54).

Algunos sujetos con enfermedad pulmonar intersticial tienen una oximetría normal en reposo, pero se desaturan durante el ejercicio (4). La desaturación de oxígeno (<88%) durante una prueba de los seis minutos marcha tiene asociado un mal pronóstico(55). Es útil e identifica pacientes con alto riesgo a los que se les debe descartar la existencia de hipertensión pulmonar concomitante y, en su caso, ser derivados de manera precoz para valoración de trasplante pulmonar.

LAVADO BRONCOALVEOLAR:

El análisis celular e inmunocitoquímico del lavado broncoalveolar (BAL) es de gran interés en la valoración diagnóstica de las EPID. El estudio de la celularidad de las EPID mediante BAL, debe acompañarse de la determinación de citoquinas y de subpoblaciones linfocitarias, al proporcionar una mayor información para el diagnóstico. En las EPID, la celularidad del BAL se caracteriza por un incremento en el número total de células y alteraciones en la distribución del porcentaje de una o de varias de las células observadas.

Existen estudios no concluyentes (56) que han determinado la relación de biomarcadores en el BAL frente a la actividad de los neutrófilos y eosinófilos en el BAL en pacientes con esclerosis sistémica para evaluar el pronóstico de estos sujetos.

CRIOBIOPSIA:

La criobiopsia es una técnica endoscópica menos invasiva que la biopsia pulmonar quirúrgica que cada vez tiene un papel más relevante en el diagnóstico de las EPID. En recientes series alcanza una rentabilidad diagnóstica del 79%(57), siendo una técnica segura y potencialmente útil. Representa una alternativa atractiva a la biopsia

pulmonar, necesitando más estudios para que pueda ser incluida en el algoritmo diagnóstico de las EPID.

BIOPSIA QUIRÚRGICA:

En ocasiones no es posible llegar a un diagnóstico y hay que recurrir a técnicas invasivas para un análisis histológico del parénquima pulmonar.

En los casos sin diagnóstico específico está indicado la realización de una biopsia pulmonar abierta o por minitoracotomía por videotoroscopia, eligiendo una u otra técnica tras una valoración inicial del paciente y de la rentabilidad diagnóstica. Se tomarán las muestras en función de los hallazgos de la TACAR, eligiendo al menos dos áreas distintas(58), seleccionando una con aspecto patológico macroscópico y otra de aspecto normal. Los beneficios de la biopsia quirúrgica son el establecer un diagnóstico clínicopatológico, minimizar los efectos secundarios de los nuevos fármacos tratando a sujetos con un diagnóstico de certeza y detectar procesos fibróticos secundarios a exposiciones específicas.

1.6. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.

Se deben distinguir las enfermedades pulmonares intersticiales de otras entidades con clínica y radiología similar:

- Insuficiencia cardíaca: se distingue por los antecedentes de patología cardíaca, la radiografía de tórax con cardiomegalia, líneas B de Kerley, derrame pleural e infiltrados de predominio perihiliar en la radiografía de tórax.

- Bronquiectasias: las imágenes del TACAR servirán para el diagnóstico diferencial.

- Neumonías: su presentación aguda puede llevar a la confusión con las alveolitis alérgicas extrínsecas.

- Linfangitis carcinomatosa: aparecerá un patrón intersticial bilateral con líneas B de Kerley.

- Infiltrados pulmonares en pacientes inmunodeprimidos: los agentes oportunistas dan un infiltrado intersticial bilateral.

Introducción

-Hemorragias pulmonares difusas: las manifestaciones clínicas (anemia, hemoptisis) suelen ser suficientes para diferenciarlas de las EPID.

-Neumonía lipoidea: se distingue por los hallazgos del LBA y de la biopsia pulmonar transbronquial o quirúrgica.

1.7. TRATAMIENTO.

Antes de iniciar un tratamiento se ha de tener establecido el diagnóstico de certeza y valorar el estadio y el pronóstico de la enfermedad. Tras esto, se han de identificar las comorbilidades como el reflujo gastroesofágico, las infecciones respiratorias o el tabaquismo, así mismo se deben tratar los síntomas que presente el paciente y tener en cuenta siempre el trasplante pulmonar, realizando una derivación precoz a los centros transplantadores. Actualmente se dispone de tratamientos antifibróticos indicados en la fibrosis pulmonar idiopática y debe considerarse el tratamiento paliativo en la fase final de la enfermedad.

TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO:

-Glucocorticoides: los glucocorticoides (CTC) son el tratamiento de elección para algunas EPID como la NINE, NOC, NID y NIL. El tratamiento tradicional de la FPI ha implicado pautas prolongadas con elevadas dosis de CTC, solos o combinados con inmunodepresores o citotóxicos. Sin embargo, varios estudios han demostrado que no existe beneficio y se ha constatado su ineficacia en los casos de FPI (59).

-Acetilcisteína (ACC): es un potente antioxidante que disminuye la respuesta fibrótica en modelos animales de fibrosis pulmonar. Las guías actuales recomiendan su uso en monoterapia de manera condicional y se manifiestan en contra de la triple terapia con CTC, Azatioprina y ACC (14). Ésta combinación fue de elección hasta que se dieron a conocer los resultados del estudio PANTHER (60) que comparaba la eficacia de placebo frente a ACC y a glucocorticoides asociados a Azatioprina, demostrándose mayores tasas de mortalidad en los sujetos con triple terapia frente al placebo.

Introducción

Un estudio previo, IFIGENIA (61) demostraba menor deterioro funcional de los sujetos que recibían monoterapia de ACC frente a placebo, o en combinación con Prednisona y Azatioprina.

-Pirfenidona (Esbriet®): es un fármaco antiinflamatorio, antifibrótico y antioxidante que inhibe la síntesis de colágeno y disminuye la fibrosis pulmonar. Ha demostrado reducir los marcadores de estrés oxidativo en animales, incluyendo los hidroperóxidos de lípidos, los productos de la lipooxidación avanzada, la superóxido dismutasa y la actividad de las mieloperoxidasas (62). En estudios en células in vitro, la Pirfenidona ha inhibido los fibroblastos, incluyendo su proliferación, la diferenciación de miofibroblastos y la síntesis de colágeno (63).

El estudio ASCEND, en el que 555 sujetos diagnosticados de FPI eran tratados con Pirfenidona o placebo, demostró una reducción en la progresión de la enfermedad, con una mejoría en el FVC, la tolerancia al ejercicio y la supervivencia libre de progresión, con un perfil de efectos secundarios aceptables (64). Tras estos resultados y basándose en las guías clínicas, desde marzo del 2011, la Agencia Europea del Medicamento lo aprobó como tratamiento en la FPI leve-moderada, definida por un FVC $\geq 50\%$ y $\leq 90\%$ y una DLCO $\geq 35\%$ y $\leq 90\%$.

Hay otros estudios(65) que demuestran que pacientes que reciben Pirfenidona tienen un descenso menor en las pruebas funcionales respiratorias y una aparente protección contra las exacerbaciones agudas comparado frente a placebo. Otros han observado (66) una reducción de la mortalidad a las 52 semanas frente a placebo. Entre los efectos secundarios más comunes están las náuseas, dispepsia, vómitos, rash o reacciones de fotosensibilidad.

-Ninténabid: es un inhibidor de la tirosin quinasa desarrollado inicialmente como un fármaco frente al cáncer. Es una pequeña molécula frente a los receptores de los factores de crecimiento endotelial vascular, plaquetario y fibroblástico. Ha demostrado tener actividad antifibrótica y antiinflamatoria en modelos animales de fibrosis pulmonar, siendo capaz de inhibir la proliferación y la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos (67).

En el ensayo (68) INPULSIS-1 y el INPULSIS-2, se incluyeron un total de 1066 pacientes a los que se le asignaba Ninténabid 150mg dos veces al día o placebo, con unos resultados de una caída del FVC de 114.7mL en el brazo del Ninténabid y de 239.9mL en el brazo tratado con placebo en el INPULSIS-1 y 113.6mL frente a

207.3mL en placebo en el INPULSIS-2. Ofrece perfiles de seguridad aceptables, siendo los efectos secundarios más frecuentes la diarrea, las náuseas y los vómitos.

En el 2015 las guías recomendaron el uso de Nintenabid para evitar la progresión de la enfermedad, el descenso del FVC y la mortalidad, con pocos efectos secundarios (14).

-Terapia antiácida: el reflujo gastroesofágico es muy prevalente en los sujetos con FPI, considerándose las microaspiraciones como un factor de riesgo que empeora la enfermedad. El tratamiento antirreflujo reduce el empeoramiento radiológico y aumenta la supervivencia (69). Además evita la disminución de FVC y los valores de la DLCO (70). Sin embargo, la recomendación de su uso está condicionada en función de la mejora de la función pulmonar y la supervivencia. Dado el bajo coste de la terapia y el potencial riesgo de neumonías evitables se requieren más estudios de seguridad a largo plazo y eficacia, así como de la interacción con otros fármacos para poder atribuirle una recomendación más firme.

-Otros fármacos antifibróticos: se están realizando nuevos estudios con moléculas diferentes. Se publicaron dos ensayos clínicos (71,72) con el Sildenafil, un inhibidor de la fosfodiesterasa-5 que estabiliza el óxido nítrico favoreciendo la vasodilatación pulmonar, sin embargo las guías actuales están en contra de su uso, quedando indicado en pacientes en los que se documente hipertensión pulmonar (14) y siempre realizado por centros expertos ya que aunque demostró una ligera mejora en la calidad de vida de los pacientes no mostraba beneficios en cuanto a mortalidad, exacerbaciones o disnea, todo ello añadido a la posibilidad de eventos adversos del propio fármaco.

El uso de los receptores antagonistas de la endotelina, como el Bosentan y el Macitentan también han sido evaluados, no siendo recomendados por las guías clínicas actuales. El Bosentan fue estudiado en dos estudios, el BUILD-1 primero(73), el cual no demostró ningún beneficio significativo sobre la mortalidad aunque los datos sugerían una mejora en los pacientes tratados con Bosentan, por lo que se realizó el BUILD-3 (74), en el que se ampliaba el tamaño muestral y se incluían solo sujetos diagnosticados de FPI por biopsia pulmonar, pero a pesar de estas modificaciones no mostró efecto concluyentes sobre la mortalidad ni sobre el FVC. En Macitentan (75) se realizó un estudio obteniendo resultados parecidos a los obtenidos con Bosentan, donde no existía diferencia significativa en los pacientes tratados frente a placebo.

Dado la etiología multifactorial y heterogénea de las EPID y la necesidad de orientar al mismo tiempo una multitud de vías profibróticas superpuestas, se cree que un tratamiento combinado podría ser la alternativa razonable, produciendo un efecto sinérgico beneficioso o un efecto aditivo. Sin embargo, la terapia combinada debe evitarse hasta que se dispongan de datos que demuestren su eficacia y tolerabilidad. En cuanto a la medicina personalizada que es tan popular en otras patologías, es poco probable de forma aislada en las EPID dado la multitud de vías de señalización implicadas simultáneamente en los procesos fibróticos.

A medida que se conoce con más precisión la compleja patogenia de la enfermedad aparecen nuevas perspectivas en busca de tratamientos eficaces y seguros que mejoren la calidad de vida y la supervivencia en los pacientes con FPI. En la actualidad se está trabajando con células humanas alogénicas, QAX576, células autólogas mesenquimales, Bevasizumab, (<https://clinicaltrials.gov>) entre otros, que podrían ser el futuro de esta enfermedad.

TRATAMIENTO NO FARMACOLÓGICO:

-Oxigenoterapia: la indicación de oxigenoterapia está basada en su uso en los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica e insuficiencia respiratoria crónica (76). El mayor requerimiento de oxígeno es un factor de riesgo asociado a la mortalidad en pacientes con FPI tras un año de seguimiento. Se recomienda la administración de oxigenoterapia ante la constatación de hipoxemia significativa en reposo o en la prueba de los seis minutos marcha ($\text{SaO}_2 \leq 88\%$).

-Rehabilitación pulmonar: la rehabilitación respiratoria puede ser un tratamiento efectivo y seguro (77). Si el entrenamiento se indica de manera individualizada, con una intensidad adecuada según la prueba de esfuerzo cardiopulmonar y teniendo en cuenta las posibles comorbilidades como la hipertensión arterial pulmonar, la afectación cardíaca o las arritmias, se podrían alcanzar beneficios importantes sobre los síntomas o la capacidad de esfuerzo. Se recomienda un entrenamiento aeróbico de baja intensidad y limitado por los síntomas.

-Trasplante pulmonar: las tasas de supervivencia en sujetos trasplantados por EPID son inferiores a las obtenidas en los trasplantados por otras patologías,

siendo del 74%, 45% y 22% al año, a los cinco años y a los diez años respectivamente (78). Sin embargo, las expectativas de vida son mejores a las del tratamiento farmacológico. Por ello, los pacientes con EPID con enfermedad progresiva deben evaluarse en una unidad de trasplante pulmonar de forma precoz, independientemente del tipo de tratamiento médico que reciban, siempre que no existan contraindicaciones para tal procedimiento quirúrgico.

-Cuidados paliativos: el tratamiento de los síntomas que asegure una calidad de vida aceptable a los pacientes es fundamental en el algoritmo terapéutico, dirigiéndose a la identificación, valoración y tratamiento precoz de síntomas como el dolor, la disnea y la tos incoercible, así como cualquier otro síntoma relacionado con la progresión de la enfermedad, tanto en la esfera física como en la psicosocial. La codeína y otros opiáceos y los glucocorticoides a bajas dosis (prednisona 5-10 mg/día) han mostrado cierta eficacia en el control de la tos. La Talidomina también ha demostrado mejorar la tos y la calidad de vida (79). Se recomienda que los cuidados paliativos sean considerados parte integrante del tratamiento de las EPID.

1.8. TIPOS DE ENFERMEDAD PULMONAR INTERSTICIAL.

1.8.1. FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA:

DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA:

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una forma específica de neumonía intersticial fibrosante crónica progresiva de causa desconocida que ocurre en adultos y está limitada al pulmón (27). Es potencialmente mortal, deteriorando el estado funcional y la calidad de vida de los pacientes. Tiene un pronóstico desfavorable con una supervivencia a los cinco años entre el 20 y el 40%, aunque la evolución de los pacientes puede variar y se ve afectada por la coexistencia de comorbilidades.

Se trata de una enfermedad rara con menos de 10 casos por 100.000 habitantes. Es la neumonía intersticial inespecífica más frecuente con una incidencia estimada de

Introducción

4,6-7,4/100.000 habitantes, con una prevalencia en mujeres de 13/100.000 habitantes y en hombre 20/100.000 habitantes. Dos tercios de los casos de FPI se presentan en pacientes mayores de 60 años, con una edad media de 66 años en el momento del diagnóstico (14), siendo poco frecuente su diagnóstico en menores de 40 años. A nivel mundial, su incidencia va en aumento, estimándose 5.000 nuevos diagnosticados cada año en el Reino Unido.

Las formas familiares de FPI se desarrollan a una edad más temprana, pero son clínica e histológicamente indistinguibles de la FPI esporádica. Las mutaciones heterocigóticas en los genes que codifican la proteína del surfactante C, proteína del surfactante A y la telomerasa son responsables del 20% del total de la FPI familiar. Un polimorfismo en el gen promotor MUC5B está asociada con un mayor riesgo tanto de FPI esporádica como familiar, aunque predice un mejor pronóstico.

Se asocia con una histopatología y una imagen radiológica de neumonía intersticial usual (NIU). El diagnóstico definitivo de FPI requiere la presencia del cuadro histológico de NIU y la exclusión de otras causas conocidas de EPID, incluyendo las EPID-CTD.

DIAGNÓSTICO:

Para el diagnóstico se debe realizar una historia clínica exhaustiva junto con pruebas complementarias comunes al resto de las EPID, descritas previamente. El consenso oficial ATS/ERS/JRS/ALAT 2011 (48) establece que con la TACAR el diagnóstico de NIU se basa en la identificación de los cuatro hallazgos “típicos” (Tabla V): una afectación pulmonar de predominio basal y localización subpleural, presencia de reticulación evidente, existencia de panalización con o sin bronquiectasias/bronquiolectasias de tracción y demostrar la ausencia de hallazgos considerados excluyentes de un patrón de NIU. La presencia de vidrio deslustrado debe ser mínima o inexistente. La panalización, formada por grupos de quistes con paredes finas, con una localización subpleural y un diámetro entre 3-10 mm, es un hallazgo imprescindible para diagnosticar con certeza el patrón de NIU. Cuando no hay panalización visible, el diagnóstico mediante la TACAR será el de posible patrón de NIU y se deberá realizar una biopsia quirúrgica(16). El valor predictivo positivo de la TACAR en el diagnóstico de la NIU es del 90 al 100%.

Hallazgos típicos de NIU:
<ul style="list-style-type: none">-Afectación pulmonar de predominio basal y subpleural.-Presencia de reticulación evidente.-Existencia de panalización con o sin bronquiectasias/bronquiolectasias de tracción.-Ausencia de hallazgos considerados excluyentes de un patrón de NIU.
Hallazgos de posible NIU:
<ul style="list-style-type: none">-Predominio subpleural, basal.-Patrón reticular.-Ausencia de las características incompatibles.
Hallazgos excluyentes de un patrón de NIU:
<ul style="list-style-type: none">-Predominio en campos medios o superiores.-Predominio peribroncovascular.-Presencia importante de vidrio deslustrado.-Numerosos micronódulos (bilaterales, lóbulos superiores).-Quistes (múltiples, bilaterales, distantes de las zonas de panalización).-Patrón de atenuación en mosaico/atrapamiento aéreo (bilateral, en 3 o más lóbulos).-Consolidación segmentaria.

Tabla V. Características radiológicas del patrón de neumonía intersticial usual NIU en la TACAR.

Si la TACAR no muestra un patrón de certeza típico de NIU, el diagnóstico definitivo deberá realizarse mediante biopsia pulmonar. El diagnóstico de FPI según la histología establece diferentes posibilidades (Tabla VI).

Patrón típico de NIU (los 4 criterios):

- Evidencia de marcada fibrosis/deformación de la arquitectura,+/- panalización con distribución predominantemente subpleural/paraseptal.
- Afectación parcheada del parénquima pulmonar por fibrosis.
- Presencia de focos fibroblásticos.
- Ausencia de características incompatibles con diagnóstico de NIU que sugieran un diagnóstico alternativo.

Patrón de probable NIU:

- Evidencia de marcada fibrosis/deformación de la arquitectura, +/-panalización.
- Ausencia de la afectación parcheada o de los focos fibroblásticos, pero no de ambos.
- Ausencia de las características incompatibles con diagnóstico de NIU que sugieran un diagnóstico alternativo.
- Solo cambios tipo penalización.

Patrón de posible NIU (los 3 criterios):

- Afectación parcheada o difusa del parénquima pulmonar con fibrosis, con o sin inflamación intersticial.
- Ausencia de otros criterios de NIU (los patrones típicos de NIU)
- Ausencia de características incompatibles con diagnóstico de NIU que sugieran un diagnóstico alternativo.

No patrón de NIU(alguno de los 6 criterios):

- Membranas hialinas.
- Neumonía organizativa.
- Granulomas.
- Marcado infiltrado celular inflamatorio intersticial además de la paralización.
- Cambios centrados predominantemente en las vías aéreas.
- Otras características sugestivas de un diagnóstico alternativo.

Tabla VI Criterios histológicos de FPI, modificada de Raghu (48)

En base a las características radiológicas e histológicas se establece un diagnóstico del siguiente modo:

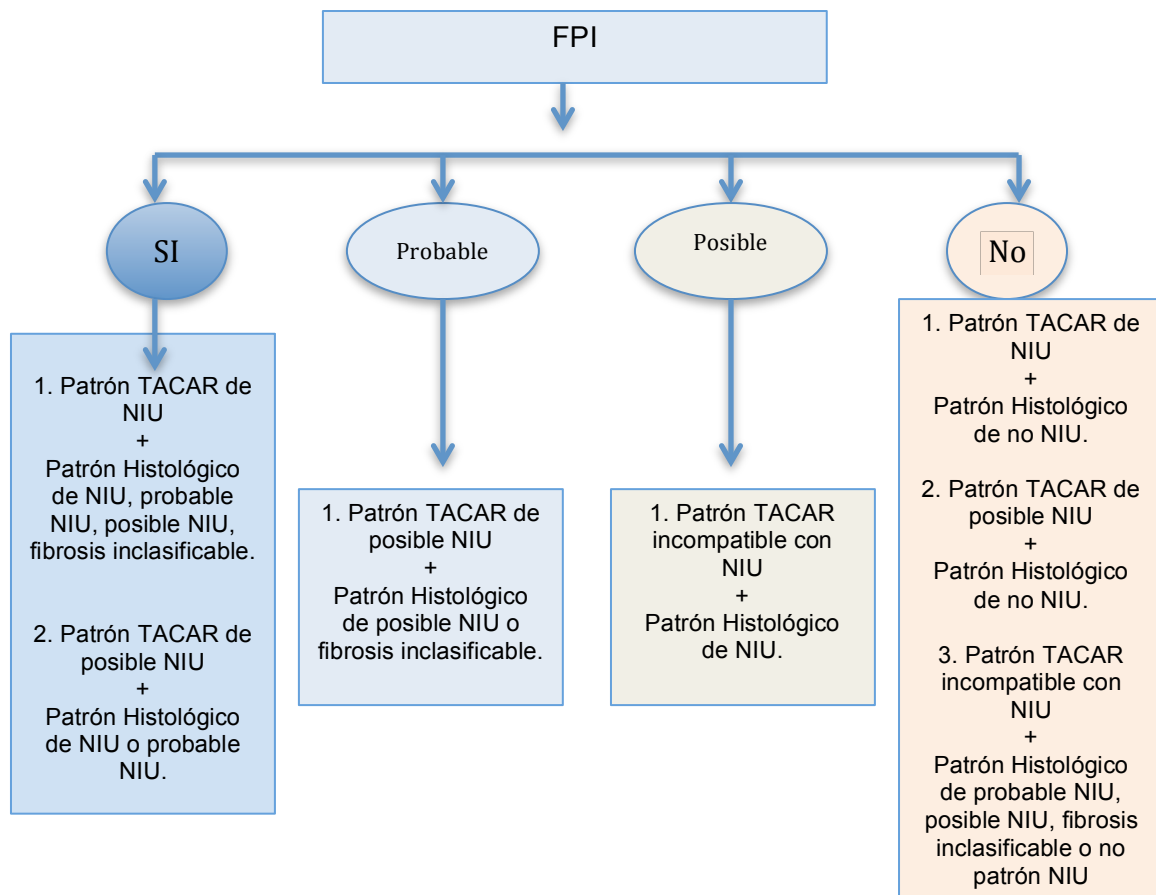


Figura 1. Diagnóstico de fibrosis pulmonar idiopática basándose en características radiológicas y de anatomía patológica.

EVOLUCIÓN:

La historia natural de la FPI es impredecible y variable en el momento del diagnóstico. Cuando progresa hay un periodo subclínico en el que únicamente están presentes los hallazgos radiológicos de la enfermedad, seguido de un periodo sintomático consistente en una fase clínica prediagnóstica y postdiagnóstica. Algunos pacientes pueden permanecer asintomáticos durante 2-3 años, no obstante, la mayoría presentan una lenta progresión con deterioro clínico y funcional que ocasiona la insuficiencia respiratoria crónica. En otros casos existen periodos de relativa estabilidad con episodios de exacerbaciones. En una minoría de los pacientes la duración es corta con una progresión más rápida. Se desconoce si las diferentes formas de historia natural representan fenotipos diferentes de la enfermedad.

Introducción

Para predecir la mortalidad en pacientes con FPI se han establecido diferentes escalas de puntuación (80), uno de ellos es el índice GAP (Índice de riesgo de mortalidad) que puntual el sexo, la edad y las pruebas funcionales para establecer un riesgo de mortalidad (Tabla VII) (81).

GAP Predictor		Puntos
Sexo	Femenino	0
	Masculino	1
Edad (años)	< 60	0
	60-65	1
	>65	2
FVC (% del valor predictivo)	>75	0
	50-75	1
	<50	2
DLCO (% del valor predictivo)	>55	0
	36-55	1
	<35	2
	No la puede realizar	3

Riesgo de mortalidad			
Estadio	I	II	II
Puntos	0-3	4-5	6-8
Mortalidad (años)			
1	5,6%	16,2%	39%
2	11%	30%	62%
3	16,3%	42%	77%

Tabla VII. Índice GAP, escala que predice el riesgo de mortalidad en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática. FVC: capacidad pulmonar total. DLCO: capacidad de difusión del monóxido de carbono.

COMORBILIDADES:

Existen comorbilidades asociadas a la FPI. A nivel pulmonar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, el cáncer de pulmón, el embolismo pulmonar y la hipertensión pulmonar. A nivel extrapulmonar, la enfermedad coronaria, el reflujo gastroesofágico, la apnea del sueño y la depresión.

La hipertensión pulmonar es más común en los pacientes con FPI grave pero puede ocurrir en cualquier estadio de la enfermedad (82). Está presente en el 20%-40% de los pacientes con FPI asociándose con un incremento de la disnea, disminución de la capacidad al esfuerzo, mayor necesidad de oxígeno y con una DLCO más disminuida que reduce la supervivencia. Se debe sospechar la coexistencia de FPI e hipertensión pulmonar cuando aparece una disnea desproporcionada con una DLCO menor del 40%, una reducción de 200 metros en el test de la marcha, saturación inferior al 88% o una recuperación de la frecuencia cardiaca al minuto menor de 13 latidos por minuto.

El reflujo gastroesofágico está presente en el 90% de los pacientes con FPI (83).

TRATAMIENTO:

Nuevos fármacos han sido aprobados en los últimos años. El Instituto Nacional para la salud y excelencia clínica (NICE) en 2013 aprobaba el uso de la Pirfenidona como tratamiento de la FPI leve-moderada (www.nice.org.uk/guidance/ta282) y en enero de 2016 aprobaba el uso del Nintenanib, ambos fármacos han supuesto un cambio en la progresión de la enfermedad.

Además, las guías actuales recomiendan el trasplante de pulmón y el oxígeno. Regímenes terapéuticos previos para la FPI que incluían la combinación de Prednisona, Azatioprina y la NAC han demostrado ser perjudiciales o ineficaces y ya no se recomiendan.

1.8.2. NEUMONÍA INTERSTICIAL NO ESPECÍFICA:

La neumonía intersticial no específica (NINE) es una enfermedad pulmonar intersticial crónica caracterizada por la homogeneidad espacial y temporal de la afectación del parénquima pulmonar. Es una entidad clinicopatológica que presentan alteraciones anatomopatológicas que no son características de otros tipos de neumonías intersticiales idiopáticas. La NINE se englobó bajo el término genérico de FPI, aunque actualmente se sabe que la NINE es una entidad totalmente diferenciada (84).

La presentación de la enfermedad es insidiosa o subaguda, con tos y disnea de esfuerzo. El 50% de los pacientes presentan síntomas sistémicos, y el 30%, acropaquias. La NINE puede ser idiopática en el 60% de los casos o estar asociada con los efectos tóxicos de los fármacos, la exposición ocupacional, hipersensibilidad, infecciones, aspiración crónica, con enfermedades granulomatosas o con la enfermedad pulmonar intersticial crónica.

La histología se extiende como un proceso predominantemente inflamatorio (NINE celular) o con predominio de fibrosis (NINE fibrótica). La radiografía de tórax y la TACAR muestran características inespecíficas, no diagnósticas. En la TACAR la

presencia de vidrio deslustrado es la alteración más frecuente. La distribución de las opacidades es a menudo simétrica con afectación de las zonas medias e inferiores. Es rara la presencia de imágenes en panal de abeja.

El pronóstico es mejor que el de la FPI (84). El tratamiento es con CTC (prednisona o equivalente), por vía oral a la dosis de 1 mg/kg de peso (máximo 80 mg), durante un mes, que se disminuye a razón de 10 mg cada 15 días, hasta 20 mg/día con reducción progresiva posterior. En casos de ausencia de respuesta a los CTC, se añadirá Azatioprina.

1.8.3. ENFERMEDAD INTERSTICIAL SECUNDARIA A CONECTIVOPATÍA:

Las enfermedades del tejido conectivo (artritis reumatoide, esclerosis sistémica, lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis/polimiositis y síndrome de Sjögren,) se presentan con frecuencia asociadas a un amplio número de afecciones torácicas, siendo la enfermedad pulmonar intersticial una de las principales causas de morbimortalidad en éstos pacientes. En hasta un tercio de los casos, la enfermedad pulmonar puede preceder a la aparición de las manifestaciones sistémicas(33). Aproximadamente el 10% de los individuos con artritis reumatoide tienen enfermedad pulmonar intersticial evidente y hasta un 30% tienen una enfermedad intersticial no diagnosticada, sin embargo, la EPID-CTD está infradiagnosticada. Tal vez una combinación bien establecida de factores de riesgo clínicos, autoanticuerpos y nuevos biomarcadores podrían identificar pacientes con artritis reumatoide con riesgo de desarrollar EPID-CTD (85).

Los patrones histológicos y radiológicos son parecidos a las formas idiopáticas. Por lo tanto, se catalogan según la clasificación de consenso de las neumonías intersticiales idiopáticas (NII) de la ATS/ERS 2002 (15). De todas ellas, las que con mayor frecuencia se asocian a las conectivopatías son la NINE y la NIU (86).

Se ha introducido el concepto de “conectivopatía-pulmón dominante” o “enfermedad intersticial pulmonar con rasgos autoinmunes”, que englobaría a aquellos pacientes con enfermedad intersticial que presentan anticuerpos y hallazgos histológicos relacionados con las conectivopatías, pero que no cumplen criterios definitivos que

Introducción

permitan diagnosticar una conectivopatía específica (87,88).

Las conectivopatías indiferenciadas se asocian con una mayor prevalencia de patrón radiológico e histológico de NIU, al sexo femenino y a una edad más temprana, aunque no hay datos claros respecto a la supervivencia (88,89).

Se han demostrado variaciones en el patrón de NIU, con un menor grado de panalización y de focos fibroblásticos, y mayor tasa de centros germinales y de inflamación, en los pacientes con EPID-CTD respecto a los que presentaban FPI(90).

Las manifestaciones clínicas, radiológicas, funcionales y los hallazgos del LBA son similares a los de las neumopatías intersticiales idiopáticas sin collagenosis asociada.

Es probable que el uso generalizado de la TACAR, la mayor conciencia de las complicaciones pulmonares en las conectivopatías, y el enfoque multidisciplinario de los pacientes hayan contribuido al diagnóstico de los casos más leves de EPID-CTD. Las guías actuales recomiendan la evaluación de los pacientes con FPI para descartar una conectivopatía subyacente, utilizando la historia clínica y la determinación de anticuerpos.

Se estudió el pronóstico en una población de atención primaria en el Reino Unido(91), donde se compararon las tasas de mortalidad y se observó que los individuos con EPID-CTD tenían mayor supervivencia (mediana de supervivencia 6,5 años) de 2.209 individuos con fibrosis pulmonar y ausencia de conectivopatía (mediana de supervivencia 3.1 años). La mediana de supervivencia fue de 8,8 años en los pacientes con esclerosis sistémica junto con enfermedad intersticial, 6,6 años en los sujetos con artritis reumatoide y patología intersticial y 5,6 en otras conectivopatías. Este pronóstico puede verse influido por un diagnóstico erróneo de NIU en pacientes con un patrón de NINE, lo cual podría explicar la mejor evolución de la enfermedad, ya que se diagnosticaban por criterios clínicos, con la posible confusión con otra neumopatía intersticial idiopática de menor gravedad. Los pacientes con artritis reumatoide y neumonía intersticial usual tienen un peor pronóstico (92).

El conocimiento de biomarcadores en el momento de la presentación de la enfermedad que puedan predecir el riesgo del deterioro de la función pulmonar que desemboque en insuficiencia respiratoria o la muerte del paciente sería extremadamente ventajoso. Anteriores estudios han demostrado que el aumento de

óxido nítrico alveolar se correlaciona con la gravedad de la EPID en pacientes con esclerosis sistémica (93).

TRATAMIENTO:

El tratamiento es el mismo que el de las NII no asociadas a colagenosis. El inicio del tratamiento inmunosupresor se justifica cuando la progresión de la enfermedad es probable, en función de la gravedad de la enfermedad pulmonar (cuando el FVC es menor del 70%). Los CTC con Azatioprina son normalmente utilizados en la enfermedad leve, mientras que la Ciclofosfamida y el Rituximab se reservan para la enfermedad severa o refractaria.

En la dermatomiositis, se ha mostrado efectiva la adición de la Ciclosporina en los casos que no responden a los CTC ni a los inmunodepresores. En la esclerosis sistémica con alveolitis (según los hallazgos de la TACAR) se ha mostrado eficaz la administración de Ciclofosfamida junto a Glucocorticoides.

Aunque el tratamiento de EPID-CTD no es una indicación autorizada de Micofenolato Mofetil o Rituximab, series publicadas demostraron la eficacia del tratamiento.

1.9. PATOGENIA.

1.9.1. GENERALIDADES:

La EPID se caracteriza por la combinación variable entre el componente inflamatorio y el componente fibrótico que afecta al espacio entre las membranas del epitelio alveolar y las del endotelio vascular (1,94).

Los hallazgos patológicos en la fibrosis pulmonar se deben a una excesiva acumulación de la matriz extracelular (ECM de sus siglas en inglés *extracellular matrix*) y una remodelación anormal de la arquitectura pulmonar. En estos trastornos

Introducción

fibróticos pulmonares se aprecia una acumulación de fibroblastos, miofibroblastos y ECM que conducen a la insuficiencia respiratoria crónica(95).

En general se acepta que en las EPID existe un cambio en el fenotipo de las células epiteliales alveolares (AECs, del inglés *alveolar epithelial cells*), que incluye la apoptosis de las mismas. El daño que se produce en las AECs, mediante múltiples mecanismos, da lugar a una fibrogénesis aberrante. Así al daño de las células epiteliales le sigue el reclutamiento y la proliferación de los fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos. Éstos pueden inducir la apoptosis de las células epiteliales.

Es posible que las células epiteliales puedan sufrir una transición epitelio mesenquimatosas (EMT, del inglés *epithelialmesenchymal transition*), durante esta transformación las células perderían sus características epiteliales y adquirirían características de células mesenquimatosas. Otra hipótesis contempla que el daño de las células tipo II provoca una falta de control sobre los fibroblastos y la síntesis de colágeno. La importancia de cada mecanismo en la fibrogénesis no está totalmente definida, pero cada uno de los mecanismos que explican la fibrosis no son excluyentes y todos pueden dar lugar a una respuesta fibroproliferativa (95).

En las últimas décadas se han publicados estudios que han ayudado a entender mejor los mecanismos moleculares involucrados en las EPID, especialmente en FPI (96, 97), sin embargo ninguno de ellos ha podido explicar totalmente los complejos procesos inherentes a esta patología ni encontrar moléculas o marcadores que definitivamente la identifiquen y permitan un seguimiento de los pacientes.

A pesar que los mecanismos precisos no son totalmente conocidos, se describen tres vías que podrían ser las responsables de la alteración de los fibroblastos, la pérdida de las células epiteliales alveolares y la acumulación excesiva de la matriz extracelular (98) responsables de la enfermedad. Los tres mecanismos que se barajan son:

- a) La inflamación y los mecanismos autoinmunes.
- b) La existencia de un medio procoagulante en el pulmón.
- c) El estrés oxidativo.

Es evidente que no existe un mecanismo único responsable de la patogenia de las enfermedades fibróticas intersticiales, sino que son la consecuencia de un proceso multifactorial en el que la interaccionan entre si provoca la enfermedad.

1.9.2. EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA ENFERMEDAD PULMONAR INTERSTICIAL DIFUSA.

ROS Y EPID:

La fibrosis que se produce en diferentes órganos incluido el pulmón se asocia a un desequilibrio redox y al estrés oxidativo. El desequilibrio redox/estrés oxidativo ocurre cuando hay un aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y una eliminación ineficiente por parte de los antioxidantes (99,100). Existe evidencia suficiente que avala el aumento del estrés oxidativo en los trastornos fibróticos (101-103).

Los principales ROS incluyen el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los radicales de hidroxilo (OH^\cdot) y el ácido hipocloroso ($HOCl$). El anión superóxido es producido por la NADPH-oxidasa, la xantina-oxidasa, la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) o la cadena de transporte de electrones mitocondrial. El superóxido pasa rápidamente a H_2O_2 por la acción de la superóxido dismutasa (SOD). Sin embargo, en presencia de óxido nítrico (NO), el O_2^- reacciona rápidamente con el NO, dando lugar a la formación de peroxinitrito altamente reactivo ($ONOO^-$), que es de tres a cuatro veces más rápido que la dismutación de O_2^- a H_2O_2 . El H_2O_2 puede cambiar a $HOCl$ por una enzima conocida como mieloperoxidasa (MPO) que se expresa abundantemente en los neutrófilos, es altamente reactiva en la inflamación. H_2O_2 también puede cambiar a OH^- altamente tóxico en presencia de Fe^{2+} . El H_2O_2 es eliminado y transformado en H_2O y O_2 por la enzima catalasa, glutatión peroxidasa (GPX) o peroxirredoxinas (Prx), todas ellas enzimas antioxidantes.

Los ROS y las especies reactivas del nitrógeno (RNS) son subproductos normales resultantes del metabolismo celular que se producen de forma continua y a niveles bajos en condiciones normales. Son capaces de desarrollar respuestas fisiológicas, formando parte de complejos procesos biológicos, actuando como moléculas de señalización y modulando una variedad de funciones como la transcripción de genes,

Introducción

el metabolismo, la proliferación, la diferenciación y la migración celular, así como la apoptosis. También intervienen en la reparación de los tejidos (101). Sin embargo, un aumento excesivo de ROS y RNS tiene un efecto perjudicial, causando estrés oxidativo y estrés nitrógeno, respectivamente, que puede conducir a la muerte celular y al desarrollo de enfermedades (104).

En comparación con otros órganos, los pulmones son particularmente vulnerables al estrés oxidativo debido que están expuestos a los más altos niveles de oxígeno, con una presión de oxígeno del aire inhalado de 150 mmHg y de 100 mmHg en el aire alveolar, mientras que las presiones de oxígeno en sangre venosa en otros órganos varían desde un máximo de 45 mmHg a un mínimo de 1 mmHg (105).

En el pulmón fibrótico se produce una falta de regulación de los mecanismos normales de reparación y como se ha hecho referencia anteriormente, se produce una disminución de la regeneración de células epiteliales con aumento de su apoptosis, una acumulación de células mesenquimatosas con un fenotipo que las hace resistentes a la apoptosis, a la inflamación crónica de bajo grado y a la inmunosenescencia. La desregulación redox contribuye a estos fenotipos celulares y a las distintas alteraciones mencionadas.

En la fibrosis pulmonar y como se ha mencionado anteriormente las AEC tipo I, que constituyen el 90% de las células epiteliales alveolares pulmonares, representan el sitio principal de la lesión y se cree que desencadenan la respuesta fibrótica (106). Mientras que los AEC de tipo II proliferan en respuesta a una lesión, los AECs tipo I son propensas a sufrir apoptosis. Estas AECs segregan varios factores de crecimiento y citocinas, como el TGF- β (107). Estas citoquinas en las AECs pueden mediar directa e indirectamente la activación profibrótica de las células mesenquimales y pueden inducir la diferenciación de los miofibroblastos. Se ha demostrado que la apoptosis de las AECs inicia la fibrosis (106,108). Así, las AEC tipo I no son sólo objetivos, sino participantes activos en el proceso fibrogénico (106).

Ante una lesión en las AECs se incrementan los ROS tanto a nivel mitocondrial como por la acción de la NADPH oxidasa a la vez que disminuye la función antioxidante, produciéndose estrés oxidativo. El TGF- β , que se incrementa en estas células, inhibe la expresión de genes que codifican la síntesis de la enzima que interviene en la producción de glutatión (GSH), por lo que aumenta la susceptibilidad celular al daño oxidativo. El estrés oxidativo produce así la apoptosis de las células. El TGF- β sigue

incrementando la formación de ROS en la mitocondria y estos ROS inducen la EMT propia del proceso fibrótico. Estas alteraciones redox en las células epiteliales producen el cambio hacia un fenotipo profibrótico o sea, hacia la muerte de las células epiteliales y la EMT. Los H₂O₂ generados en las células tiene efectos similares al TGF- β .

Los miofibroblastos que se forman además inducen la muerte de las AECs por el incremento de producción de H₂O₂, a través de la NADPH oxidasa. Los ROS en forma de H₂O₂ y HOCl, producidos por los neutrófilos y macrófagos que aparecen en el proceso inflamatorio y fibrótico, contribuyen a incrementar el daño epitelio alveolar.

Como se ha planteado con anterioridad el daño epitelial provoca reclutamiento y proliferación de fibroblastos. Los fibroblastos pueden diferenciarse en miofibroblastos. Éstos incrementan su función contráctil, la producción de ECM y su fenotipo antiapoptótico (100). La acumulación de miofibroblastos o focos fibroblásticos es una de las características histopatológicas de la FPI y se relaciona con la capacidad pulmonar y el curso de la enfermedad (109).

La actividad NADPH oxidasa está incrementada en los fibroblastos en la FPI y es necesaria para cambiar al fenotipo profibrótico. NADPH oxidasa produce H₂O₂ y ésta alteración redox favorece la diferenciación de los miofibroblastos (110).

Se ha podido comprobar que los miofibroblastos en la FPI tienen niveles bajos del factor nuclear eritroide 2 (Nrf2). El Nrf2 es un factor de transcripción responsable de la activación de elementos de la respuesta antioxidante (ARE) y de la inducción de genes involucrados en esta defensa (111). Se ha demostrado en modelos animales como el Nrf2 protege de la fibrosis pulmonar (112).

1.9.3. EPID Y LOS PRODUCTOS RESULTANTES DEL IMPACTO DE ROS.

En este grupo se incluyen:

- ✓ Productos finales de la glicación avanzada (AGE).
- ✓ Productos de la oxidación avanzada de las proteínas (AOPP).
- ✓ Productos de la oxidación de lípidos y dentro de ellos:

-Productos finales de la peroxidación de lípidos. Se ha seleccionado uno de los más investigados; malondialdehído, (MDA) mediante la reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) (113).

-Los Hidroperóxidos de lípidos (LOOH): productos intermedios no radicales de la peroxidación lipídica formados en el organismo a través de vías enzimáticas y no enzimáticas.

PRODUCTOS FINALES DE LA GLICACIÓN AVANZADA:

Los productos finales de la glicación avanzada (AGEs) comprenden un grupo heterogéneo que se forman por una combinación de glicación, oxidación y/o carbonilación (114). La formación de AGEs se acumula en los tejidos de forma fisiológica con el envejecimiento, pero, además, tiende a aumentar en situaciones de estrés oxidativo y en enfermedades inflamatorias. Así los sujetos en situación de hiperuricemia o hiperglucemia presentan valores aumentados, por lo tanto, el exceso de AGE puede ser utilizado como un sistema de medida de la exposición al estrés oxidativo durante la vida. Esto es particularmente cierto en los tejidos de baja renovación donde permanecen acumulados.

Su formación se produce por tres vías diferentes. El mecanismo clásico de formación de AGE es la reacción lenta de Maillard entre la glucosa o los azúcares reductores y las proteínas. La interacción entre los grupos carbonilo de azúcares reductores y los grupos amino de las proteínas dan como resultado la formación de una base de Schiff en unas pocas horas. El reordenamiento intramolecular de la base de Schiff resulta en productos Amadori más estables. La hemoglobina glicosilada es un ejemplo de un producto Amadori que es ampliamente utilizado en la práctica clínica para el diagnóstico y la regulación de la diabetes mellitus. El lento proceso de oxidación de los productos Amadori conduce a compuestos de carbonilo reactivos y posteriormente a la formación de AGEs dentro de semanas a meses. Los AGEs más conocidos derivados de este proceso de glicoxidación (glicación y oxidación), son la pentosidina, Nε-carboximetil-lisina y glucosapana (115).

La pentosidina, uno de los miembros mejor caracterizados de los AGE, se forma mediante glicoxidación (entre pentosas y grupos amino libres de los aminoácidos lisina o arginina de las proteínas). Los pacientes diabéticos, en comparación con individuos sanos, muestran valores más elevados de pentosidina en el plasma. Así se propone la

pentosidina como un nuevo biomarcador de las complicaciones en la diabetes mellitus (116).

Otros procesos que evolucionan mucho más rápidamente y que implican la formación de AGE son la peroxidación de lípidos y la vía de la glicólisis. En la vía de la peroxidación de lípidos, los ROS alteran los lípidos dando peróxidos lipídicos y/o derivados carbonilos citotóxicos. Esto se traduce en el incremento de los AGEs o de los productos finales de lípidos avanzados, por ejemplo el malondialdehído. Esta reacción tiene lugar tanto intracelular como extracelularmente (117).

Por lo tanto bajo estrés oxidativo la formación y la acumulación de AGEs aumentan. Así, la acumulación de AGEs se puede utilizar como un marcador de la exposición al estrés oxidativo durante la vida.

Los AGEs se han visto relacionados con diferentes patologías (118-120) incluyendo su implicación a nivel pulmonar (121-122) ya que inducen la acumulación excesiva de la matriz extracelular y la expresión de citoquinas profibróticas tales como el TGF- β (123). Se ha podido demostrar una acumulación de AGE en modelos murinos de fibrosis pulmonar inducidos por Bleomicina (124).

Los AGEs causan daño tisular local al afectar a la estructura de las proteínas, mediante la formación de enlaces cruzados entre las moléculas o mediante la unión del receptor para el AGE (RAGE). La unión al RAGE desencadena respuestas inflamatorias, induce el estrés oxidativo y a su vez provoca la sobreexpresión del RAGE. Esto puede, finalmente, conducir a un aumento de la remodelación tisular (125). RAGE es un receptor multiligando que en función del ligando puede tener diferentes funciones patofisiológicas (126). Se encuentra normalmente a niveles bajos en la mayoría de los tejidos de los adultos sanos. Sin embargo, el tejido pulmonar muestra un nivel relativamente alto, en condiciones normales (127), está altamente expresado en las células alveolares tipo I (128) en comparación con otras células pulmonares.

La unión RAGE y AGE ha demostrado iniciar la señalización celular proinflamatoria, la expresión de moléculas de adhesión celular, citoquinas, y la activación de diversos factores de transcripción (129). Además activan al factor de transcripción nuclear κ B que participa en la regulación de más de cien genes relacionados con la proliferación celular o la apoptosis (130). El papel de la activación del RAGE por el AGE en múltiples patologías es actualmente sujeto de investigación y de estrategias

farmacológicas. Se ha implicado en patología pulmonar como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, el síndrome de distrés respiratorio, el cáncer de pulmón (131) (132) y la fibrosis pulmonar (122).

PRODUCTOS DE OXIDACIÓN AVANZADA DE LAS PROTEÍNAS:

El estrés oxidativo induce alteraciones en la conformación o estructura de las proteínas siendo capaz de inducir la disfunción proteica o la inhibición de su degradación (133). Los productos de la oxidación avanzada de las proteínas (AOPPs) son sustancias originadas a partir de la oxidación proteica que se generan como resultado de las reacciones de oxidación. AOPP se forma como resultado de la reacción entre las proteínas plasmáticas y los oxidantes clorados, como el HOCl (134). Ya que los AOPP suprimen la proliferación celular por la activación del factor de transcripción nuclear κB e inducen muerte celular, los niveles sistémicos de AOPPs se incrementan en numerosas enfermedades inflamatorias crónicas, con incremento del estrés oxidativo (135).

Los AOPPs puede desencadenar explosiones oxidativas de los neutrófilos, monocitos y células fagocíticas, aumentar la generación de especies reactivas del oxígeno y promover la secreción de citocinas para acelerar la lesión de las células endoteliales. Además de ser productos del estrés oxidativo crónico, los AOPPs también pueden desencadenar a su vez estrés oxidativo. Se ha demostrado que AOPP estimula la generación de ROS en una variedad de células a través de un mecanismo que sugiere fuertemente un papel de las NADPH oxidasas (136).

Los AOPP se usan como biomarcadores de estrés oxidativo en el desarrollo y la progresión de numerosas enfermedades y afecciones crónicas. Entre estas patologías se incluyen el síndrome metabólico, la obesidad, enfermedades inflamatorias, enfermedades neurodegenerativas y el cáncer (137). Debido a la heterogeneidad de las patologías descritas que se caracterizan por la acumulación de AOPP, es evidente que los AOPP no son meramente un marcador de activación de neutrófilos (138).

La detección de sus niveles y la inhibición de la formación de AOPPs puede proporcionar un enfoque novedoso para controlar el progreso y mejorar el pronóstico de diferentes enfermedades (138). En el pulmón se han encontrado niveles séricos elevados de AOPP en diversas entidades patológicas incluyendo la fibrosis pulmonar

(139-141) reflejando su relación con la fibrosis pulmonar y el estrés oxidativo.

HIDROPERÓXIDOS DE LÍPIDOS:

Todas las membranas celulares contienen fosfolípidos que forman bicapas lipídicas, consecuencia de su naturaleza anfipática. Un componente importante en la parte hidrófoba de algunos fosfolípidos son los ácidos grasos poliinsaturados, que poseen funciones esenciales en la estructura de la membrana y en la fisiología celular. Además, los ácidos grasos poliinsaturados están presentes en partículas de lipoproteínas que transportan triacilglicerol y colesterol. Estos ácidos grasos poliinsaturados debido a sus átomos de hidrógeno bisalílicos, son particularmente susceptibles al estrés oxidativo (142).

Los lípidos oxidados, también conocidos como hidroperóxidos lipídicos (LOOH) y peróxidos lipídicos, pueden formarse en presencia de radicales libres de oxígeno. Los enlaces dobles de los ácidos grasos poliinsaturados, tales como el ácido linoleico, son más susceptibles a la oxidación por los ROS (143).

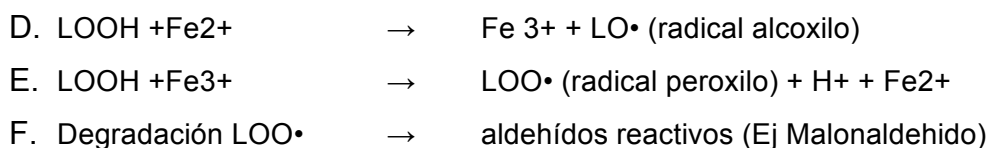
Las reacciones de peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de membrana comienzan cuando los radicales libres de oxígeno extraen átomos de hidrógeno. Debido a que un átomo de hidrógeno tiene sólo un electrón, la pérdida de hidrógeno de un grupo metileno deja un electrón sin aparear en el átomo de carbono adyacente y el lípido se convierte en un radical alquílico ($L\cdot$). A continuación, la reacción de radicales lipídicos con moléculas de oxígeno (O_2) forma un radical peroxilo ($LOO\cdot$). Los radicales peróxidos son capaces de extraer un átomo de hidrógeno de los lípidos adyacentes para formar los LOOH, a veces también llamados peróxidos lipídicos. Una vez que se inicia la cadena de formación del LOOH, se vuelve autopropagante. Estos eventos se muestran en el siguiente esquema desde la letra A hasta la C:



Los complejos reducidos de hierro (Fe^{2+} , Fe^{3+}) pueden reaccionar con los peróxidos lipídicos para formar agentes oxidantes fuertes, tales como los radicales alcóxilo ($LO\cdot$) y peroxilo $LOO\cdot$ (Esquema letras D y F). Los radicales peroxilo pueden ser

Introducción

degradados a diferentes aldehídos reactivos como el manolaldehído (MDA) que participa en numerosos procesos patológicos y vías de transducción.



Los peróxidos de lípidos y los radicales de oxígeno son responsables de muchas de las reacciones perjudiciales. Estimulan las reacciones de peroxidación tóxicas para las células y las membranas celulares. Pueden dañar las membranas biológicas y eventualmente causar la descomposición completa de las membranas (143). Los productos de descomposición de la peroxidación lipídica pueden afectar a las proteínas de la membrana por reticulación, haciéndolas inútiles en su función receptora o enzimática.

Los aldehídos que pueden medirse en plasma y orina como un índice indirecto del estrés oxidativo, en comparación con los radicales libres, son relativamente estables y pueden difundirse o incluso escapar de la célula ya que la acción de los LOOH podría manifestarse a distancia del sitio de origen al migrar de unas membranas a otras originando cambios patológicos. Por lo tanto, no sólo son productos finales y restos de procesos de peroxidación de lípidos, sino que también pueden actuar como "segundos mensajeros citotóxicos". Se ha demostrado que algunos de estos aldehídos presentan una reactividad fácil con diversas biomoléculas, incluyendo proteínas, ADN y fosfolípidos, generando productos estables al final de una serie de reacciones que se cree contribuyen a la patogénesis de muchas enfermedades. La modificación de aminoácidos por aldehídos α , β -insaturados se produce principalmente en los residuos de cisteína (144).

Aunque las células del organismo están normalmente dotadas de defensas enzimáticas capaces de reducir los LOOH a hidróxidos menos reactivos, los LOOH y los aldehídos a los que dan lugar puede acumularse en condiciones patológicas y se cree que son los responsables de algunos procesos fisiopatológicos incluyendo la aterogénesis (145), las lesiones por isquemia de reperfusión, y la carcinogénesis inducida por rayos uva. Además, pueden estar implicados (146) en la vía de señalización del estrés, provocando una variedad de respuestas celulares a partir de la inducción de enzimas antioxidantes a la muerte apoptótica.

PRODUCTOS FINALES DE LA PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS. MANOLALDEHIDO. SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO:

MDA existe principalmente en dos formas, libre o unido a proteínas, ácidos nucleicos, lipoproteínas y ciertos aminoácidos. El MDA se une con el acetaldehído en cierta concentración y en conjunto con una proteína que forma aductos (adición y producto) cíclicos y aductos de estructura abierta. Tanto el MDA circulante como el aducto de los aminoácidos solubles no suele estar en el plasma humano y es excretado a través de la orina.

El MDA se cuantifica típicamente a partir de muestras de plasma, siendo el método más popular un ensayo colorimétrico basado en la reacción entre MDA y el ácido tiobarbitúrico (TBA). Sin embargo, aunque es adecuado para un análisis de alto rendimiento, este ensayo de sustancias que reaccionan con el TBA (TBARS, de sus siglas en inglés *Thiobarbituric acid reactive substances*) carece de especificidad para el MDA, ya que puede reaccionar con aldehídos distintos produciendo compuestos que absorben en el mismo rango que el MDA.

Los TBARS, por tanto, se forman como subproducto de la peroxidación lipídica, siendo considerados el marcador estándar de la oxidación de los lípidos, que se aumentan en diferentes enfermedades (147). Como se ha hecho referencia anteriormente, las especies reactivas de oxígeno (ROS) tienen una vida media muy corta, son difíciles de medir directamente, en su lugar, lo que puede medirse son varios productos originados por el estrés oxidativo, como los TBARS que constituyen un método bien establecido para el cribado y la monitorización de la peroxidación lipídica.

Los TBARS y el MDA circulante son uno de los biomarcadores de estrés oxidativo más ampliamente utilizados (148). Varios estudios han investigado el MDA como biomarcador potencial para evaluar el estado de estrés oxidativo en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica utilizando el método de TBARS (113).

1.9.4. EPID Y DEFENSA ANTIOXIDANTE.

En las EPID no solo hay un aumento de la oxidación, sino que se produce a su vez

una alteración del equilibrio con los antioxidantes. Esta disrupción del balance oxidantes-antioxidantes en el pulmón es un paso clave en el desarrollo de muchas patologías. Las enzimas antioxidantes juegan un papel fundamental en el control y en la prevención de las enfermedades pulmonares relacionadas con el estrés oxidativo como lo son las EPID. Junto a ellas, los tioles contrarrestan los efectos perjudiciales del aumento del estrés oxidativo.

TIOLES:

Los tioles son compuestos que contienen el grupo funcional formado por un átomo de azufre y un átomo de hidrógeno (-SH), es por tanto un compuesto orgánico de azufre que contiene un grupo sulfhidrilo. En los sistemas biológicos, los tioles se encuentran en la cisteína y en moléculas de bajo y alto peso molecular. Los tioles son buenos reductores.

El principal compuesto tiol en el cuerpo es el aminoácido cisteína, que es susceptible a la oxidación. La oxidación de un residuo de cisteína puede cambiar la función de una proteína. La cisteína es uno de los residuos de aminoácidos menos abundantes en las proteínas, representando menos del 3% del total de los aminoácidos. Sin embargo, a pesar de su baja concentración, la capacidad del grupo tiol para donar electrones y para oscilar entre un estado reducido (-SH) y diversos estados oxidados, le permite a este residuo participar en muchos aspectos de la estructura y de la función de las proteínas.

Los diferentes estados de oxidación del grupo tiol de los residuos de cisteína son el ácido sulfénico (-SOH), el ácido sulfínico (-SO₂ H), el ácido sulfónico (-SO₃ H) y el puente disulfuro (-S-S-). La oxidación a ácido sulfénico y la formación de un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína, es reversible por agentes reductores, pero los ácidos sulfínico y sulfónico no pueden ser reducidos a cisteína.

Los tioles erradican moléculas de oxígeno reactivo a través de vías enzimáticas y no enzimáticas (149,150). Los tioles de bajo peso molecular, como la cisteína, la homocisteína, el GSH y la albúmina, así como las proteínas con grupos tioles, constituyen el pool de tioles plasmáticos. Los tioles se implican en reacciones de oxidación con moléculas oxidantes, formando enlaces de disulfuro. La homeostasis

Introducción

tiol/disulfuro es esencial para la detoxificación, la regulación de las vías de señalización, la apoptosis y la regulación de las reacciones enzimáticas.

En plasma la concentración de tioles es baja y el tiol que predomina es la albumina sérica (HSA de sus siglas en inglés *human serum albumin*). El total de tioles reducidos en plasma suma ~0.4-0.6 mM. Dentro de este grupo, los tioles reducidos de bajo peso molecular están representados por la cisteína, la cisteinil-glicina, el GSH, la homocisteína y el γ -glutamil-cisteína, que en conjunto constituyen sólo 12-20 μ M. Notablemente, el GSH total es ~ 6 μ M y ~55% reducido. Para los otros tioles de bajo peso molecular, el porcentaje reducido con respecto al total es ~ 4% para la cisteína, 9% para la cisteinil-glicina, 3% para la homocisteína y 1% para la γ -glutamil-cisteína. El tiol más abundante en plasma es la HSA, ~ 0,6 mM, y se reduce en su mayor parte (~ 75%).

La mayor parte de las investigaciones disponibles sobre la pareja tiol/disulfuro y el estrés oxidativo se han centrado en el glutatión GSH/GSSG intracelular. Sin embargo, en el medio extracelular la pareja tiol/disulfuro redox consiste en cisteína (Cys)/cistina (CySS) es igualmente importante.

El estrés oxidativo extracelular, a través de la oxidación de Cys/CySS, podría activar directamente las vías sensibles que estimulan la expresión diferencial de genes que controlan la proliferación de fibroblastos y el depósito de matriz extracelular. (151),

El GSH, un tiol de bajo peso molecular, es el antioxidante primario de las enzimas en la matriz extracelular y puede inhibir la activación oxidativa de las metaloproteinasas (152). Su relación en la patogenia de la fibrosis pulmonar ha quedado demostrada en varias líneas de investigación, evidenciando que el agotamiento de este tiol se asocia con la FPI (153,154).

SUPERÓXIDO DISMUTASA:

La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima antioxidante que juega un papel protector en las células ante la desproporcionada cantidad de radicales libres(155).

En los mamíferos, hay tres isoformas de superóxido dismutasa que constituyen la principal defensa antioxidante enzimática contra la superoxidación. La isoforma extracelular (EC-SOD o SOD3), se expresa a altos niveles en el pulmón en

Introducción

comparación con otros tejidos (156,157). Es expresada por las células epiteliales bronquiales, las células del endotelio vascular, células alveolares tipo II y los macrófagos alveolares (158).

La EC-SOD ha sido considerada como una de las más importantes enzimas antioxidantes del pulmón, implicada en un gran número de enfermedades pulmonares, donde modula la lesión oxidante, la inflamación y la fibrosis (158). Así la EC-SOD ejerce sus propiedades antifibróticas, en parte mediante la prevención de la degradación oxidativa de la ECM e impidiendo la liberación de productos de degradación de la ECM que pueden aumentar fibrosis por los efectos sobre el epitelio pulmonar, mesenquimal y sobre las células inflamatorias(159).

Su capacidad de unirse directamente a varios componentes en la matriz extracelular le permite existir en altas concentraciones. Un mecanismo por el que se conoce que la EC-SOD ejerce su efecto protector en el pulmón es mediante la unión directa y la prevención de la fragmentación oxidativa (160) del colágeno tipo I, del tipo IV, el hialurónico, y los proteoglicanos del heparán sulfato(161). Además, se ha observado que los fragmentos oxidantes derivados del colágeno tipo I y tipo IV son también potentes quimioatrayentes. Por lo tanto, la pérdida de EC-SOD de la matriz puede resultar en un aumento de la fragmentación oxidativa de sus componentes, la amplificación de la inflamación y la fibrosis.

EC-SOD contiene un dominio de unión heparán sulfato y heparina. Este dominio está formado por un grupo de residuos de arginina y lisina cargados positivamente que le confiere afinidad por la matriz extracelular. Estos dominios de unión le permiten unirse además a las superficies celulares en los tejidos (162). La unión de su dominio al heparán sulfato de la matriz es sensible a la proteólisis, por lo que las proteasas en una matriz alterada pueden actuar para liberar EC-SOD. La proteólisis del dominio de unión al heparán sulfato de EC-SOD se ha observado en los pacientes con enfermedad pulmonar dando como resultado el agotamiento de EC-SOD del parénquima pulmonar y la acumulación de EC-SOD proteolizada en el lavado broncoalveolar de los sujetos enfermos(163).

El heparán sulfato es un polisacárido expresado de forma ubicua que aparece en las superficies celulares y en la matriz extracelular en forma de proteoglucano. Tiene gran diversidad estructural y ha sido implicado en numerosos procesos biológicos. Una de sus funciones principales es unir factores de crecimiento y otras proteínas, incluyendo EC-SOD a la matriz del tejido. El ion superóxido contribuye a la degradación mediada

por ROS del heparán sulfato in vitro. Existen proteoglicanos del heparán sulfato, como el sindacano-1, en las superficies celulares, que son el principal sustrato de la metaloproteinasa de la matriz 7 (MMP-7). Es conocido el papel profibrótico de la MMP-7. La escisión del sindecano-1 de las superficies celulares deja a ésta libre, contribuyendo a la inflamación pulmonar. Además, se ha comprobado el papel de los sindecanos en la fibrosis de ratones knockout para EC-SOD. En estos ratones se ha demostrado una acumulación de sindecanos en el fluido de revestimiento alveolar después de la fibrosis pulmonar inducida por Bleomicina, de este modo, la inhibición de la fragmentación oxidativa de los sindecanos puede ser todavía otro mecanismo en el que EC-SOD inhibe la fibrosis en el pulmón (158).

Los ratones knockout que carecen de EC-SOD (161) aumentan la fibrosis por el agotamiento de EC-SOD intersticial, lo que puede contribuir a más estrés oxidativo en la matriz extracelular promoviendo aún más la respuesta fibrótica. Otro trabajo ha puesto de manifiesto que la exposición a sílice en los trabajadores altera la actividad de la SOD, incrementándose la actividad en aquellos pacientes con silicosis (164).

Por último, en su función antioxidante y antifibrotica, la EC-SOD puede prevenir el daño pulmonar disminuyendo la activación de la ECM, a través de la activación de mecanismos protectores antioxidantes (158).

1.9.5. MATRIZ EXTRACELULAR Y SU RELACIÓN CON EL ESTRÉS OXIDATIVO.

La importancia de las metaloproteinasas en la fibrosis pulmonar surgió al publicarse trabajos que relacionaban la MMP-7 con la fibrosis en modelos animales y se vio que además estaba sobreexpresada en pulmones con FPI (165). Actualmente existe abundante evidencia que confirma que el desequilibrio entre las metaloproteinasas contribuye a la patogenia de la fibrosis pulmonar.

La degradación de la ECM y la remodelación está regulada por la actividad de enzimas metaloproteinasas de la matriz (MMP) y su inhibidor tisular homólogos (TIMP). Las MMPs son proteinasas que degradan la matriz, una familia relacionada estructural y funcionalmente con las proteasas dependientes del zinc implicadas en la degradación de los componentes de la ECM (166).

Introducción

Los ROS son capaces de activar las MMPs a través de dos vías, activando su transcripción e inactivando a los TIMPS (167). Por lo tanto, los oxidantes pueden jugar un papel significativo en la actividad no regulada de las MMPs en la fibrosis pulmonar. MMPs comparten un modelo terminal común de activación “el interruptor de la cisteína” donde por la disrupción de la actividad del sitio cistina-zinc permite la escisión y la activación de enzimas latentes (168). Así modificaciones en el “interruptor de la cisteína” por los ROS pueden activar a las MMPs.

Dentro de las MMPs, la MMP7 es el miembro más pequeño, capaz de degradar múltiples componente de la matriz extracelular. Se describe como una de la más firmemente relacionadas con la patogenia de la fibrosis pulmonar. Existen numerosos datos en modelos experimentales y humanos para apoyar que MMP7 juega un papel crítico en el desarrollo de fibrosis(169).

MMP-7 puede promover una respuesta fibrótica a través de sus efectos reguladores sobre la reparación del epitelio y a través de la regulación de la liberación del TGF- β . El TGF- β a su vez podría promover el crecimiento de fibroblastos y su supervivencia. Por lo tanto, el papel de MMP-7 en la fibrosis pulmonar es probablemente pleiotrópico, debido a sus diversas funciones biológicas, estando implicado en la apoptosis, la inflamación, la fibroproliferación y la inmunidad innata. Se defiende que la MMP-7 puede ser utilizada como un potencial biomarcador.

Los niveles en el lavado broncoalveolar de MMP7 en pacientes con FPI son más altos en comparación con los controles sanos, lo que sugiere que los niveles del BAL se pueden correlacionar con la actividad en el pulmón. Sin embargo, MMP7 no parece ser específico para FPI, ya que su expresión en el BAL y en el tejido pulmonar no han sido significativamente diferentes en pacientes con FPI de otras enfermedades pulmonares intersticiales (170) lo que sugiere que el aumento de la expresión de MMP-7 no es específico de la FPI (169).

2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACION

Material y métodos

Las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) representan un grupo heterogéneo de trastornos respiratorios, en su mayoría crónicos y asociados a una alta morbilidad y mortalidad. La clasificación descrita por la ATS/ERS(16) ha ayudado a diferenciar con mayor precisión este tipo de patologías, sin embargo a pesar de múltiples ensayos e investigaciones siguen siendo un reto por su dificultad diagnóstica y su manejo terapéutico.

Pese a que cada vez se conocen más los mecanismos moleculares involucrados en las enfermedades pulmonares intersticiales, especialmente en la fibrosis pulmonar idiopática (96,97), ninguno de ellos ha podido explicar totalmente los complejos procesos inherentes a esta patología ni encontrar moléculas o marcadores que definitivamente la identifiquen y permitan una mejoría en la asistencia de los pacientes.

Se describen tres mecanismos que podrían ser los responsables de la alteración de los fibroblastos, la pérdida de las células epiteliales alveolares y la acumulación excesiva de la matriz extracelular (98), causantes de la enfermedad. Los tres mecanismos son la inflamación y los mecanismos autoinmunes, la existencia de un medio procoagulante en el pulmón y el estrés oxidativo.

La fibrosis, característica de éstos procesos, se asocia a un desequilibrio redox y al estrés oxidativo. Actualmente se hace hincapié en los biomarcadores del estrés oxidativo en diferentes patologías incluyendo la patología fibrótica pulmonar (105,122).

Todos estos hechos sugieren que los factores derivados del estrés oxidativo podrían considerarse biomarcadores para las EPID. Estos biomarcadores mejorarían en gran medida el diagnóstico y el seguimiento de los pacientes mediante técnicas menos invasivas, más fáciles de realizar y de menor coste de las que actualmente se disponen. Sería igualmente deseable que estos biomarcadores ayudasen a establecer estrategias terapéuticas en las entidades patológicas incluidas en las EPID.

OBJETIVO PRINCIPAL:

Determinar la validez de los niveles séricos de los factores derivados del daño oxidativo y de las defensas antioxidantes, como biomarcadores en la enfermedad pulmonar intersticial difusa.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

1. Determinar en sangre periférica los marcadores de daño oxidativo, para valorar su poder diagnóstico para cada una de las patologías motivo de estudio: fibrosis pulmonar idiopática (FPI), neumonía intersticial no específica (NINE) y enfermedad pulmonar intersticial difusa asociada a conectivapías (EPID-CTD).

2. Establecer la relación entre los niveles de los marcadores de daño oxidativo en sangre y la clínica del paciente.

3. Valorar en sangre los niveles de los antioxidantes de cada uno de los tipos de EPID y establecer si discriminan entre enfermos y personas sanas.

4. Determinar la relación entre la capacidad antioxidante y la clínica de los pacientes.

5. Valorar el papel como posibles biomarcadores de los productos del estrés oxidativo y de las defensas antioxidantes en las EPID.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. POBLACIÓN A ESTUDIO.

Se han seleccionado 55 pacientes diagnosticados de EPID según los criterios de la ATS/ERS/JRS/ALAT(15), de ellos 29 sujetos habían sido diagnosticados de fibrosis pulmonar idiopática, 12 sujetos tenían enfermedad pulmonar intersticial no específica y 14 sujetos enfermedad pulmonar secundaria a conectivopatía. Los pacientes realizaban seguimiento en la consulta monográfica de enfermedades pulmonares intersticiales del Servicio de Neumología del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga entre octubre del 2010 y Junio del 2015. A estos pacientes, previa firma del consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética de la investigación provincial de Málaga, se les midieron en sangre periférica, marcadores de estrés oxidativo y de capacidad antioxidante.

De la historia clínica de todos los pacientes incluidos en el estudio, se recogieron datos demográficos, clínicos y del tratamiento que estaban realizando. Aunque se disponía de pruebas funcionales respiratorias al diagnóstico y durante las posteriores revisiones, se volvieron a realizar en el momento de la extracción de la muestra. Como se explica en los criterios de exclusión e inclusión, se seleccionaron solo aquellos pacientes a los que se les había realizado una TACAR en los seis meses previos a comenzar esta investigación.

En este estudio se incluyeron además 30 sujetos sanos que constituían el grupo control. Fueron apareados en sexo y edad con los pacientes. Se les realizó radiografía de tórax y pruebas funcionales respiratorias simples.

3.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN.

3.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

-Sujetos de ambos sexos mayores de 18 años.

Material y métodos

- Diagnóstico de enfermedad pulmonar intersticial según los criterios de la ATS/ERS/JRS/ALAT (15).
- Disponer de un TACAR realizado en un periodo inferior a seis meses desde la recogida de la muestra, sin evidencias de empeoramiento, ni agudización del proceso.
- Poder extraer al paciente una muestra de sangre periférica.
- Firma del consentimiento informado.

3.2.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- Sujetos menores de 18 años.
- Diagnóstico concomitante de una neoplasia activa o que hayan recibido radioterapia previamente.
- No disponer de un TACAR realizado en los seis meses previos a la extracción de la muestra.
- Negativa a firmar el consentimiento informado.
- Sujetos diabéticos y/o con nefropatía.
- Pacientes con antecedentes en su historia clínica de hiperuricemia.
- Pacientes a los que no se les pudiera extraer una muestra de sangre periférica.

3.3. RECOGIDA DE LAS MUESTRAS.

Muestra de sangre:

Material y métodos

Las muestras de sangre venosa se extrajeron después de 8 horas de ayuno por venopunción simple y se recogieron en tubos que contenían ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o gel activador de la coagulación. El suero se obtuvo tras 60 minutos de reposo a temperatura ambiente.

Los tubos se centrifugaron a 3500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos a 4°C para separar el plasma/suero del paquete celular. El suero, plasma y el paquete celular (tubo de EDTA) así obtenido, se alicuotó y se almacenó a -70°C. Las muestras de sangre y suero de todos los sujetos fueron analizadas en la Universidad de Málaga.

3.4. EVALUACIÓN DE LOS PRODUCTOS RESULTANTES DEL IMPACTO DE ROS.

Todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y eran de calidad analítica.

3.4.1. EVALUACIÓN DE LOS AGE.

La detección de AGE en suero por fluorescencia específica se midió según la intensidad de fluorescencia de las muestras de suero diluidas a 440nm, después de la excitación a 370nm, utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia (F-4010; Hitachi, de Tokio, Japón) que opera a temperatura ambiente (171).

La Fluorescencia se expresó como la intensidad de fluorescencia relativa en unidades arbitrarias (AU). Rodamina B se usó como control interno.

3.4.2. CUANTIFICACIÓN DE AOPP.

Los AOPPs en el plasma se evaluaron utilizando un microensayo adaptado a Cobas Mira de acuerdo con García-Fernández et al 2008(172), y basado en el método original de Witko-Sarsat et al(134).

Dicho método consiste en la mezcla de 18 μL de plasma o de estándares de cloramina-T (ch-T), 400 a 6,25 mol/L, en cada cubeta del autoanalizador Cobas Mira, con 200 μL de reactivo. El reactivo se compone en un 81% de fosfato tampón (PBS), el 15% es ácido acético y el 4% de 1,1 mM de yoduro de potasio. Tras un minuto de incubación se leyó la absorbancia a 340 nm frente al blanco de reacción, obteniéndose la concentración de AOPP sobre la base de equivalentes ch-T medidos. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron del 1% y del 5%, respectivamente.

3.4.3. CUANTIFICACIÓN DE LOOH.

Se evaluaron los hidroperóxidos lipídicos en suero siguiendo el método descrito por García-Fernández et al 2008(172), éste se basa en el método FOX2 automatizado al COBAS por Arab y Steggen(173).

En este método se añade 180 μL de una solución de naranja de xilenol de 167 μM a 25 μL de suero, se incuban durante 5 minutos. Después se realiza la primera lectura óptica, y posteriormente se añade 45 μL de 833 μM de hierro II D-gluconato. Tras 10 minutos se realiza la lectura final. La concentración de LOOH en suero se calcula extrapolando una curva estándar de hidroperóxido de tert-butilo. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron del 3% y del 8%, respectivamente.

3.4.4. CUANTIFICACIÓN DE TBARS.

Para la detección de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) se utilizó el *KIT comercial de Cayman* que a través de la cuantificación colorimétrica (530-540nm) determina los niveles de TBARS realizados en placas con micropocillos. El procedimiento se basa en la degradación de los hidroperóxidos de los lipídicos dando como resultado la formación de malondialdehído (MDA) y éste reacciona a altas temperaturas (90-100°C) y en un medio ácido con el ácido 2-tiobarbitúrico, dando lugar a un complejo estable que puede ser medido.

3.5. EVALUACIÓN DE LOS FACTORES ANTIOXIDANTES.

3.5.1. CUANTIFICACIÓN DE LOS TIOLES.

Los tioles totales en el plasma se evaluaron utilizando un microensayo adaptado a Cobas Mira de acuerdo con García-Fernández et al 2008 (172) basado en el método original de Halliwell(174).

En este método los grupos sulfhidrilos (-SH) de plasma se determinaron mediante el uso del reactivo de Ellman 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoate)-DTNB adaptado a Cobas Mira. En él se mezclan 10 µL de plasma con 200 µL de una solución tamponada de Tris-EDTA (20mM, 10mM), pH 8,2. Tras 30 segundos de incubación se añade 8 µL de DTNB 10mM. Se incuba de nuevo diez minutos para realizar la lectura frente a un blanco de una solución tamponada tris. La concentración de -SH en plasma se calcula extrapolando una curva estándar de glutatión. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron del 1,2% y del 6%, respectivamente.

3.5.2. EVALUACIÓN DE TAS.

Se calculó la capacidad reductora total del suero utilizando el kit comercial "*Total Antioxidant Status*" (Randox, Reino Unido), que mide a 600 nm la formación de los radicales ABTS utilizando el reactivo ABTS®, en presencia de H₂O₂ y peroxidasa(175).

El método se calibró usando el estándar incluido en el kit.

3.5.3. EVALUACIÓN DE EC-SOD.

La concentración másica de SOD extracelular se midió en plasma usando un kit comercial de *mybiosource* para Human SOD3 (*Superoxide Dismutase 3, Extracellular*)

MSB2514105. El kit utilizado emplea el método competitivo-ELISA.

El rango de detección para este kit va desde los 6.25ng/mL a los 400ng/mL. El límite de detección es de 3.75ng/mL

3.5.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE EC-SOD.

En resumen y como se ha descrito previamente (172) se procesaron 160µL de plasma diluido usando un sistema basado en la oxidación de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH)(176). El plasma se combinó con 160µL de tampón 100mM de trietanolamina/dietanolamina-HCl, pH 7,4; 5 µL de una solución que contenía 100mM de EDTA, 50mM de MnCl₂ y 8µL de NADPH 7,5mM.

La reacción comenzó al añadir 20µL de mercaptoetanol, 10mM. Los superóxidos se generaron a partir de oxígeno molecular en presencia del EDTA, el MnCl₂, y el mercaptoetanol. NADPH se oxida en presencia del superóxido a una velocidad predecible, disminuyendo a 340nm la absorbancia. Ésta disminución es inhibida por la presencia de EC-SOD endógena. Las muestras se testaron para determinar la actividad de NADPH oxidasa antes de la adición de mercaptoetanol.

La actividad de EC-SOD se estimó a partir de una curva estandarizada construida al medir la actividad de cantidades conocidas de Cu/Zn-SOD (Sigma). Una unidad es equivalente a 21,5ng de Cu/Zn-SOD y obtiene como resultado una inhibición del 50% de la velocidad de oxidación de NADPH en comparación con el control negativo del tampón de trietanolamina/dietanolamina. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron del 2,5% y del 8%, respectivamente.

3.5.5. EVALUACIÓN DE POLIMORFISMOS DE EC-SOD.

Para el análisis del polimorfismo de la EC-SOD se ha utilizado un kit comercial de extracción de ADN sanguíneo, *ISOLATE II Genomic DNA Kit*, el cual está diseñado para el aislamiento rápido y eficiente del ADN genómico, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Material y métodos

Para el lisado de la sangre, se añade 25µl de una solución de proteinasa K a 200µl de la muestra en un tubo de microcentrifugado de 1.5ml. Se añaden 200µl de tampón G3 de lisis y se agita enérgicamente durante 10-20s. Tras ésto se incuba a 70°C durante 10-15 minutos añadiéndose después 210µl de etanol (96-100%). Se coloca una columna de centrifugación del kit en un tubo de recogida de 2ml y se carga la muestra sobre dicha columna, centrifugándose un minuto. La columna se dispone en un nuevo tubo de recogida de 2ml. Luego se procede al lavado y secado de la membrana de sílice, añadiéndose 100µl de Elución Buffer G (70°C) directamente sobre el centro de la membrana, y por último se incuba a temperatura ambiente un minuto y se centrifuga otro minuto.

Después de la extracción del DNA se usaron los siguientes iniciadores para la amplificación:

5'-CGCCAGGCG CGGGAACACTCAG-3'.

5'-GGCGGACTTGCACTC GCTCTCG-3'.

Se indujo un desajuste en ambos cebadores: uno de ellos para eliminar el segundo sitio de digestión para MwoI y el de reducir la formación de estructuras secundarias del par de cebadores. Se realizaron amplificaciones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en volúmenes de reacción de 10 µl que contenían 100 ng de ADN genómico con AmpliTaqGold Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Después de la amplificación, los fragmentos de PCR se digirieron con MwoI (BioLabs, Beverly, MA, EE.UU.). Las longitudes de los productos de PCR fueron de 63 pares de bases (pb) para el alelo menor (el alelo Gly213) y de 28 pb y 35 pb para los alelos principales (el alelo Arg213). Los productos de reacción se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 4% teñido por Gelstar (FMC Bioproducts, Rockland, MN, EE.UU.).

3.6. CUANTIFICACIÓN DE MMP 7.

Las concentraciones másicas de MMP en suero se obtuvieron usando un kit de ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay No: MBS2021023 para MMP-7.

Material y métodos

El kit de ELISA utilizaba el método de inmunoensayo enzimático en *Sandwich-ELISA* para la medición cuantitativa de MMP-7, con anticuerpos específicos. El rango para MMP 7 está entre 0.156 y 10ng/mL. El límite de detección de MMP-7 fue de 0,065ng/ml.

El procedimiento de cuantificación se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones incluidas en los *kit*.

Se realizó una dilución previa de la muestra acorde al rango de concentración de la curva patrón.

3.7. ESTUDIO ESTADÍSTICO.

Se introdujeron todas las variables recogidas en una base de datos mediante Microsoft Excel 2007 y se comprobaron todos los datos para la detección de posibles errores en la transcripción.

En el análisis de la muestra se calcularon medidas descriptivas de tendencia central (media aritmética y mediana) y de dispersión (desviación estándar) para variables cuantitativas, y se expresó la frecuencia absoluta y el porcentaje para variables cualitativas.

En el análisis inferencial se han utilizado T Student y Análisis de la varianza para el caso de variables resultado cuantitativas, dependiendo de que la variable factor tuviese dos o más niveles y Chi cuadrado para las relaciones de variables cualitativas entre sí.

En el caso de T Student y ANOVA se comprobó previamente la homocedasticidad (igualdad de varianzas) y normalidad. Cuando las condiciones de normalidad no se cumplían se realizaron las pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis, para la comparación de la distribución de los niveles séricos de los biomarcadores en pacientes frente a controles, y entre los diferentes tipos de EPID y controles, respectivamente.

Material y métodos

Para evaluar la fuerza de asociación entre las variables se realizó la correlación de Pearson (r) o Spearman (Rho) en la regresión lineal simple. Si el valor de “ r ” fue menor de 0,30 la asociación se consideró débil, si se obtuvo un valor entre 0,30 y 0,70 la asociación se consideró moderada y si fue superior a 0,70 la asociación se consideró como fuerte.

Para identificar el poder de discriminar de las diferentes variables mediadas en suero, y su valor como posible biomarcador, se calcularon las curvas ROC (del inglés *Receiver Operating Characteristic*), determinando el área bajo la curva (AUC), la sensibilidad y especificidad de cada marcador.

La sensibilidad y la especificidad fue calculada para los puntos de corte usando el índice de Youden ($J_{\max} [\text{sensibilidad} - 1]$) estableciendo el mejor punto de corte o *cutoff* para el diagnóstico.

En todos los casos se consideró como índice de confianza el 95% y el criterio para la significación estadística cuando la significación obtenida fue inferior al 5% ($p < 0,05$).

El análisis estadístico se ha realizado mediante el software IBM. SPSS. statistics versión 20 para Macintosh.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.

4.1.1. VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS.

Los 55 pacientes diagnosticados de enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID) tenían una edad media de 62,64 años y los 30 individuos sanos que formaron el grupo control 58,33 años, no apreciándose diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla VIII).

De los pacientes con EPID, 29 sujetos fueron diagnosticados de fibrosis pulmonar idiopática (FPI), 12 sujetos de enfermedad pulmonar intersticial no específica (NINE) y 14 sujetos de enfermedad pulmonar secundaria a conectivopatía (EPID-CTD).

La edad media para FPI fue $63,33 \pm 2,74$ años (media \pm ESM); $62 \pm 3,78$ para NINE y $60 \pm 2,94$ años para EPID-CTD, no existiendo tampoco diferencias con los sanos ni entre los distintitos tipos de EPID (Tabla VIII).

En cuanto al género, el 62,22% de los pacientes fueron hombres y un 37,78% mujeres. En el grupo control el porcentaje fue similar con 60% y 40% de hombres y mujeres respectivamente (Tabla VIII).

La proporción de fumadores en los sujetos con FPI es del 13,79%, 58,62% exfumadores y 27,59% no fumaron nunca. De los sujetos con NINE fumaban el 33,33%, habían dejado de fumar el 33,33% y nunca habían fumado el 33,33%. En los sujetos con EPID-CTD fumaban el 14,28%, no fumaron nunca el 21,42% y eran exfumadores el 64,28%. La dosis acumulada media es de 37,6 paquetes/año en el grupo de pacientes. Se tuvo en cuenta el hábito tabáquico para el estudio de todas las variables medidas en sangre periférica.

El tiempo medio de seguimiento en consulta desde el diagnóstico de los pacientes era de $38,93 \pm 6,65$ meses en el grupo de FPI, $43,71 \pm 7,88$ meses en NINE y $44,77 \pm 12,81$ meses en los pacientes con EPID-CTD, sin que existiesen diferencias significativas en el tiempo de seguimiento.

Resultados

	FPI (n=29)	NINE (n=12)	EPID-CTD (n=14)	Control (n=30)	P
Edad (años)	63,33 \pm 2,74	62,71 \pm 3,78	60 \pm 2,94	58,33 \pm 3,46	NS
Sexo					
Hombre	19 (65,52%)	7 (58,33%)	6 (42,86%)	18 (60%)	NS
Mujer	10 (34,48%)	5 (41,66%)	8 (57,14%)	12 (40%)	

Tabla VIII. Datos epidemiológicos de la población motivo de estudio.

Se estudiaron las comorbilidades y se observó hipertensión arterial en el 38,7% y dislipemia en un 35,5%. El 9,7% estaban diagnosticados de síndrome de apnea hipopnea del sueño. Como complicación de la enfermedad intersticial un 9,7% de los enfermos habían desarrollado hipertensión pulmonar.

Los sujetos fueron interrogados respecto a la exposición a sustancias orgánicas, siendo afirmativo en un 4,44%, sustancias inorgánicas un 4,44% y exposición a fármacos relacionados con la patología pulmonar en otro 4,44%. Además, se tuvieron en cuenta los antecedentes familiares con diagnóstico de EPID (11,11% de los pacientes con EPID).

Estas variables se tuvieron en cuenta en la valoración de los posibles biomarcadores.

4.1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.

VARIABLES CLÍNICAS:

Se analizaron las variables clínicas en los pacientes con EPID en el momento de la extracción de la muestra de sangre y se utilizaron para establecer una correlación entre el estado del paciente y los marcadores en sangre periférica. Se analizó la evolución objetiva del paciente mediante los criterios aprobados por la ATS/ERS (177), en los que se incluyen el grado de disnea, la saturación de oxígeno, las pruebas

Resultados

funcionales respiratorias y la TACAR, todo ello se describe posteriormente, valorándose su relación con los factores séricos.

PATRÓN RADIOLÓGICO:

Se tomó como referencia el patrón radiológico informado por tres radiólogos expertos en radiología torácica. Los TACAR habían sido realizado en los seis meses previos a la extracción de la muestra de sangre.

Los patrones radiológicos quedan agrupados en tres grupos:

- Patrón radiológico de NIU(45), entendido como una disminución global del volumen pulmonar, presencia de opacidades pulmonares de tipo reticular de localización basal y periférica, y la existencia de panalización, presente en 29 sujetos (52,73%).
- Patrón radiológico de NINE (45)entendido como vidrio deslustrado periférico, en las zonas medias y basales de ambos pulmones, presente en 12 sujetos (21,81%).
- Otro patrón diferente con características de los otros dos anteriores en 14 sujetos (25,45%).

TRATAMIENTO:

Los pacientes realizaban diferentes regímenes terapéuticos individualizados en función del estadio de la enfermedad, la clínica y las recomendaciones basadas en la evidencia (14). Existiendo así sujetos tratados con Corticoides, Acetilicisteina, anticuerpos monoclonales, inmunosupresores o combinaciones con varios de éstos.

4.1.3. VARIABLES DE FUNCIÓN RESPIRATORIA.

Al total de la población se le realizaron pruebas de función respiratoria en el momento de la extracción de la muestra de sangre. En el caso de los pacientes, las pruebas funcionales respiratorias fueron completas mientras que a los sujetos sanos se les realizó una espirometría simple para descartar la existencia de patología pulmonar no conocida.

Resultados

Los valores de FVC y FEV₁ eran significativamente más bajos en todos los sujetos enfermos respecto a los sanos (controles)) ($P \leq 0,006$ y $P \leq 0,001$, respectivamente) (Tabla IX). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre FPI, NINE y EPID-CTD, aunque se observa una tendencia a valores más bajos, incluyendo la DLCO en sujetos con diagnóstico de EPID-CTD.

Variable	Enfermos (n=55)	Controles (n=30)	P
FVC ml FVC %	2257 ± 166 66% ± 3%	3141 ± 263 111% ± 5%	0,006
FEV1 ml FEV1 %	2021 ± 147 74% ± 4%.	2543 ± 236 99% ± 5%	0,001
DLCO%	46% ± 4%	NE	
DCLO/VA	74,32 ± 23,58	NE	

Tabla IX. Valores de las pruebas funcionales respiratorias en los pacientes de EPID y en los controles. (%) Porcentaje del valor predicho. NE. No evaluado. . (Media ± ESM).

4.2. PRODUCTOS RESULTANTES DEL IMPACTO DE ROS.

4.2.1. PRODUCTOS RESULTANTES DEL IMPACTO DE ROS/RNS: AGES Y AOPP, DIFERENCIA ENTRE ENFERMOS DE EPID Y SANOS.

Los niveles en sangre periférica de AGEs y AOPP en el grupo de enfermos fueron significativamente superiores a los que se obtuvieron en los sujetos sanos ($P \leq 0,002$) (Tabla X).

Los niveles séricos medios de AGEs, expresados en unidades arbitrarias (AU), en los enfermos de EPID fueron 3005,03 ± 256,36 (media ± ESM) frente a 1918,5 ± 145,72

Resultados

en los sanos ($P \leq 0,002$). (Tabla X).

Los niveles de AOPP para EPID y controles fueron $427,01 \pm 71,37 \mu\text{M}$ y $173,81 \pm 24,71 \mu\text{M}$, respectivamente ($P \leq 0,004$). (Tabla X).

Sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas en LOOH y TBARS entre los enfermos de EPID y los controles. (Tabla XI).

Producto resultante del impacto de ROS/RNS	Enfermos (media \pm ESM)	Controles (media \pm ESM)	P
AGEs AU	$3005,03 \pm 256,36$	$1918,5 \pm 145,72$	0,002
AOPP μM	$427,01 \pm 71,37$	$173,81 \pm 24,71$	0,004

Tabla X. Niveles medios obtenidos en sangre periférica de AGEs y AOPP en sujetos diagnosticados de EPID y sanos (controles). Los niveles son más altos en los individuos enfermos (UA. Unidades arbitrarias).

Producto resultante del impacto de ROS/RNS	Enfermos (media \pm ESM)	Controles (media \pm ESM)	P
LOOH μM	$13,58 \pm 1,56$	$12,57 \pm 0,80$	0,79
TBARS μM	$1,32 \pm 0,14$	$1,66 \pm 0,16$	0,06

Tabla XI. Niveles medios obtenidos en sangre periférica de LOOH y TBARS en sujetos diagnosticados de EPID y sanos (controles).

4.2.2. PRODUCTOS RESULTANTES DEL IMPACTO DE ROS: DIFERENCIAS ENTRE FPI Y EPID-CTD.

Como se ha recogido en la metodología, se pretendía comparar los niveles de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en los diferentes grupos de pacientes con EPID, o sea los diagnosticados con FPI, NINE y EPID-CTD. Del estudio se excluyeron, sin embargo, los pacientes con NINE debido a defectos en el

Resultados

procesamiento de las muestras de sangre, por lo que fue insuficiente el número de enfermos para estas comparaciones. El estudio solo se realizó con los pacientes de FPI y EPID-CTD.

AGEs DIFERENCIA ENFERMOS CON FPI Y EPID-CTD:

Al valorar los niveles de AGE en FPI y EPID-CTD se encontraron diferencias significativas en ambos grupos ($P \leq 0,038$). Así los niveles de AGEs fueron mayores en EPID-CTD $3917,14 \pm 566,36$ que en FPI $2728,93 \pm 300,45$. (Fig. 2).

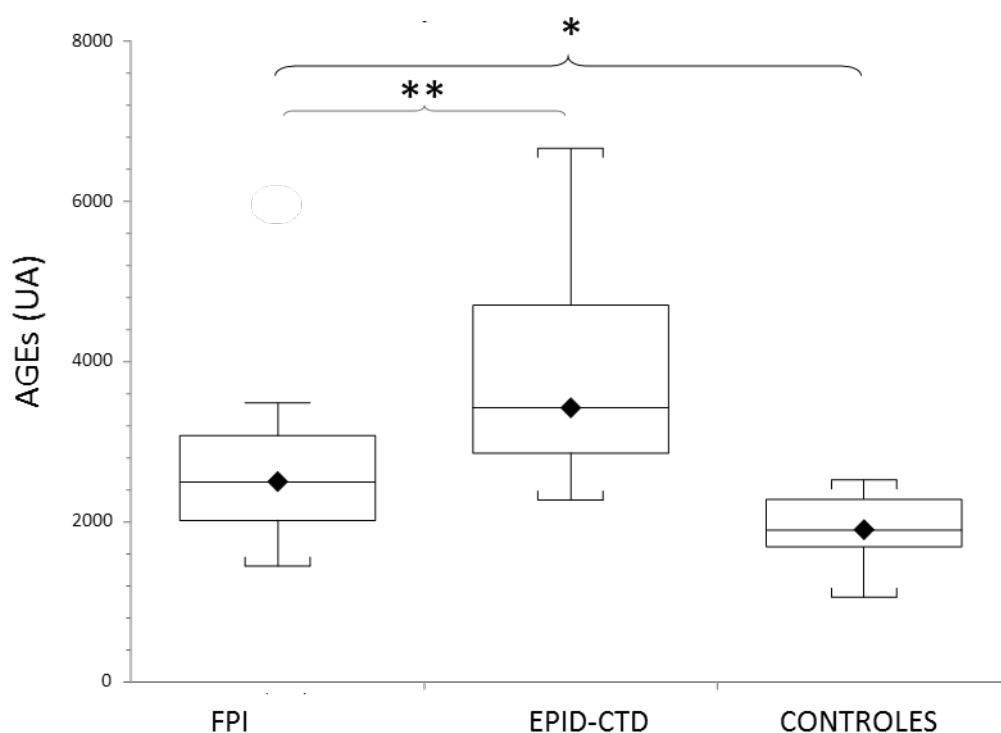


Figura 2. Niveles séricos de AGEs en los pacientes afectados de FPI y EPID-CTD y en individuos sanos (controles). Se aprecian niveles más altos en los pacientes con EPID-CTD que en los pacientes con FPI (** $P \leq 0,002$). Los niveles son significativamente más altos para los sujetos con FPI y EPID-CTD vs controles (* $P \leq 0,03$). (Medianas, cuartiles y rango).

AOPP DIFERENCIA ENFERMOS DE EPID DE SANOS:

Los niveles en sangre periférica de AOPP no fueron estadísticamente diferentes entre los pacientes de FPI y los de EPID-CTD. Solo se vio una tendencia, con niveles

Resultados

superiores en FPI ($469,66 \pm 121,11$) respecto a EPID-CTD ($274,99 \pm 50,07$), sin que estas diferencias fuera estadísticamente significativa (Fig. 3).

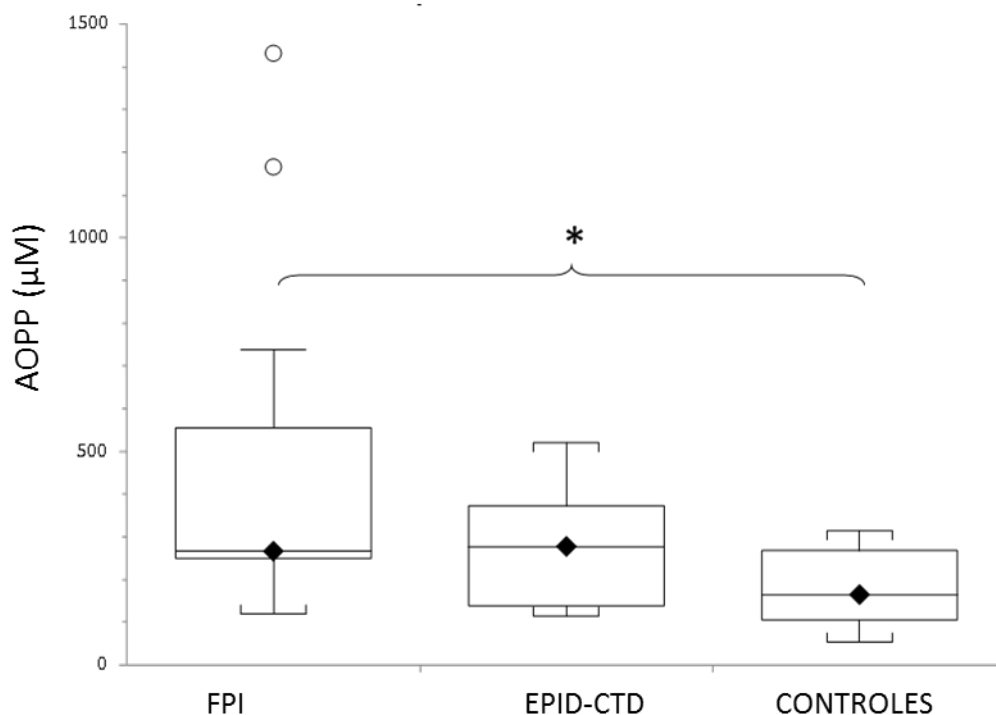


Figura 3. Niveles séricos de AOPP en los pacientes afectados de FPI y EPID-CTD y en individuos sanos (controles). Los niveles son significativamente más altos para los sujetos con FPI y EPID-CTD vs controles (* $P \leq 0,02$) Los círculos blancos representan los valores atípicos leves.

4.3. FACTORES ANTIOXIDANTES.

4.3.1. FACTORES ANTIOXIDANTES DIFERENCIAN ENTRE EPID Y SANOS.

Los niveles obtenidos para los factores antioxidantes son significativamente mayores en los enfermos que en los sanos (Tabla XII), excepto para la actividad de EC-SOD. La concentración en sangre de EC-SOD en los enfermos fue de $244,87 \pm 25,40$ ng/ml y en sanos $153,54 \pm 18,69$ ng/ml ($P \leq 0,03$). Los niveles de tioles también estaban elevados en los enfermos de EPID ($91,21 \pm 4,47$ μM) cuando se compararon con los sanos (controles $74,68 \pm 3,82$ μM) ($P \leq 0,02$).

Resultados

El resultado de la medida del estado de antioxidantes totales (TAS) también puso de manifiesto un incremento significativo en los enfermos $1,77 \pm 0,04$ mM respecto a los sanos (controles) $1,59 \pm 0,03$ mM/L ($P \leq 0,02$).

No se encontraron sin embargo diferencias estadísticamente significativas en la actividad de EC-SOD siendo para los enfermos de $2,59 \pm 0,17$ U/mL y para los controles de $2,23 \pm 0,23$ U/mL.

Antioxidantes	Enfermos	Controles	P
EC-SOD ng/mL	$244,87 \pm 25,40$	$153,54 \pm 18,69$	0,03
TAS mM	$1,77 \pm 0,04$	$1,59 \pm 0,03$	0,02
Tioles totales μ M	$91,21 \pm 4,47$	$74,68 \pm 3,82$	0,02
EC-SOD U/mL	$2,59 \pm 0,17$	$2,23 \pm 0,23$	0,23

Tabla XII. Niveles de los diferentes marcadores antioxidantes en sangre periférica de sujetos enfermos frente a sanos (controles). A excepción de la actividad de EC-SOD, expresada en U/mL, todas las defensas antioxidantes eran significativamente mayores en los enfermos de EPID.

Al estar elevados los valores de todas las defensas antioxidantes en los pacientes respecto a los controles, se analizó la relación con el tratamiento con Acetilcisteína (ACC). Solo en el caso de los tioles se encontraron diferencias significativas, que justificaban la influencia de la ACC en las concentraciones de tioles en sangre. Así los pacientes tratados con ACC tenían niveles más altos que aquellos que no la tomaban. El análisis estadístico puso de manifiesto niveles totales más altos en los tratados con ACC ($98,86 \pm 5,76$) que los no tratados ($74,83 \pm 3,92$) ($P \leq 0,002$). En el caso de los pacientes tratados mantenían las diferencias con los sanos (controles) ($P \leq 0,008$). Sin embargo, los pacientes sin tratamiento con ACC tenían valores similares a los controles (Fig. 4).

Resultados

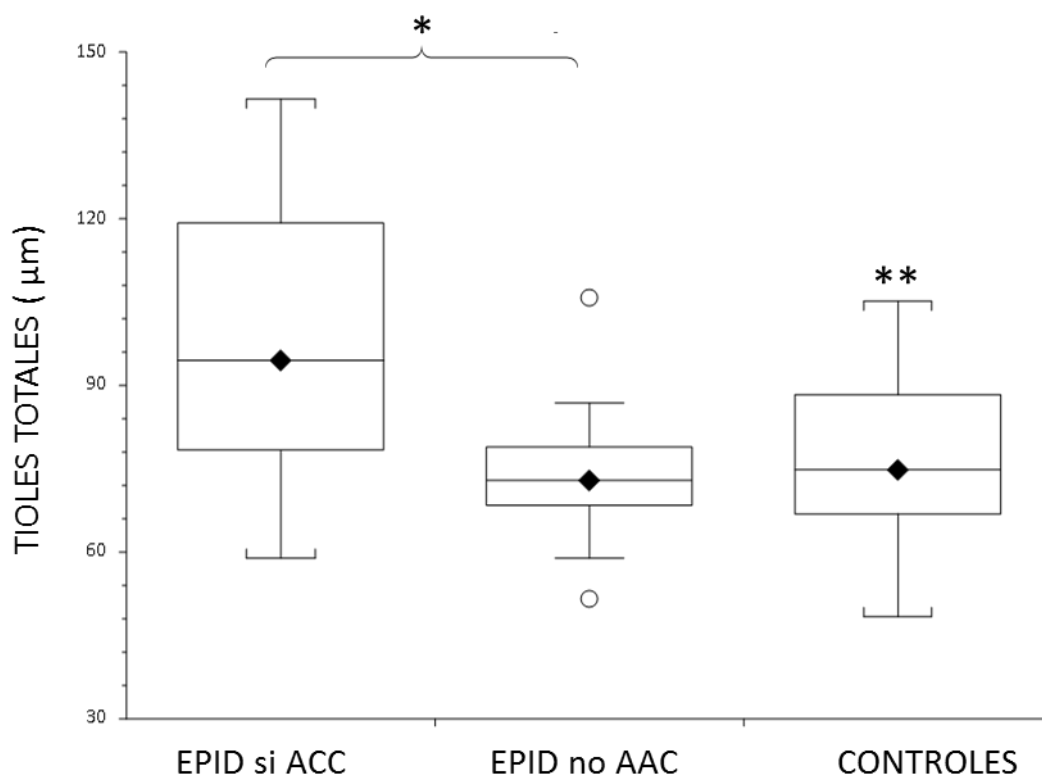


Figura 4. Niveles séricos de tioles totales en los pacientes con EPID tratados con Acetilcisteína (ACC) y sin tratamiento con ACC y sujetos sanos (controles). Los niveles son significativamente más altos para los pacientes tratados con ACC ($*P \leq 0,002$). Los círculos blancos representan los valores atípicos leves. ($**P \leq 0,008$, pacientes tratados vs Controles).

4.3.2. FACTORES ANTIOXIDANTES. DIFERENCIAS ENTRE FPI Y EPID-CTD.

Al dividir a los pacientes afectados de EPID en los grupos de FPI y EPID-CTD no solo no se encontraron diferencias significativas en los niveles en suero de tioles totales y TAS, sino que se perdía la significación de éstos con el grupo de sujetos sanos (controles). Sin embargo, no ocurrió igual con la concentración en sangre de EC-SOD (ng/ml), que aunque no existían diferencias significativas entre FPI y EPID-CTD, en ambos grupos de pacientes, EC-SOD mantuvo niveles más altos que los controles (Fig. 5).

Resultados

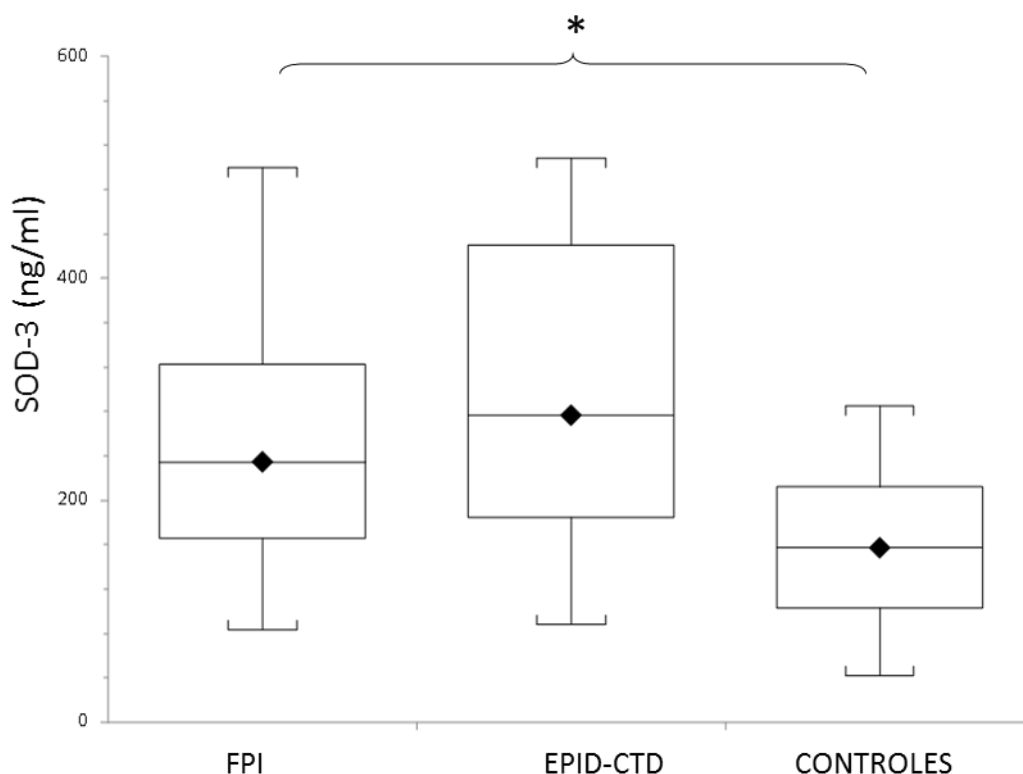


Figura 5. Niveles séricos de EC-SOD en los pacientes afectados de FPI, de EPID-CTD y en individuos sanos (controles). Los niveles son significativamente más altos para los sujetos con FPI y EPID-CTD vs controles (* $P \leq 0,01$).

4.3.3. BALANCE FINAL ENTRE LOS PRODUCTOS RESULTANTES DE LA OXIDACIÓN/ANTIOXIDANTES. BALANCE INCREMENTADO EN LOS ENFERMOS DE EPID.

La capacidad de los organismos para hacer frente al daño oxidativo depende de la eficacia de los antioxidantes dentro de los tejidos y/o en la sangre para contrarrestar el daño oxidativo. Por lo tanto, se evaluó el equilibrio redox mediante la relación oxidantes/antioxidantes (relación OX/AntiOX).

Se han comparado los parámetros de daño oxidativo (AGE, AOPP y TBARS) frente a los de propiedades antioxidantes (TAS, Tioles totales y actividad EC-SOD). Los datos indican que la media de la relación OX/AntiOX era en los sujetos controles ($51,97 \pm 6,49$) significativamente más baja que en los enfermos ($140,97 \pm 26,60$) ($P < 0,01$) (Tabla XIII) (Figura 6). El cociente menor supone una mayor capacidad antioxidante.

Resultados

Se determinó la relación OX/AntiOX según el siguiente cociente:

TBARS μM +AOPP μM +AGES*,01 UA /TAS mM +TT μM *,001+SOD U/mL.

Balance OX/AntiOX	Enfermos	Controles	P
OX/antiOX	140,97 \pm 26,60	51,97 \pm 6,49	0,01

Tabla XIII. Balance de los productos resultantes de la oxidación y de los antioxidantes. El cociente entre los productos de oxidación y los antioxidantes en sangre periférica es menor en los individuos sanos (controles).

Se valoró si este cociente se veía modificado por el tratamiento con ACC, sin que existieran diferencias estadísticamente significativas, si bien el cociente en los que tomaban ACC fue ligeramente menor (104,17 \pm 20,91) que en los que no la tomaban (161,13 \pm 41,52), manteniéndose en ambos casos las diferencias significativas con los individuos sanos. No se encontraron diferencias entre los pacientes de FPI 140,94 \pm 45,80 y EPID-CDT 189,83 \pm 38,18 conservando los cocientes más alto en ambos grupos que en los controles ($P \leq 0,01$).

Resultados

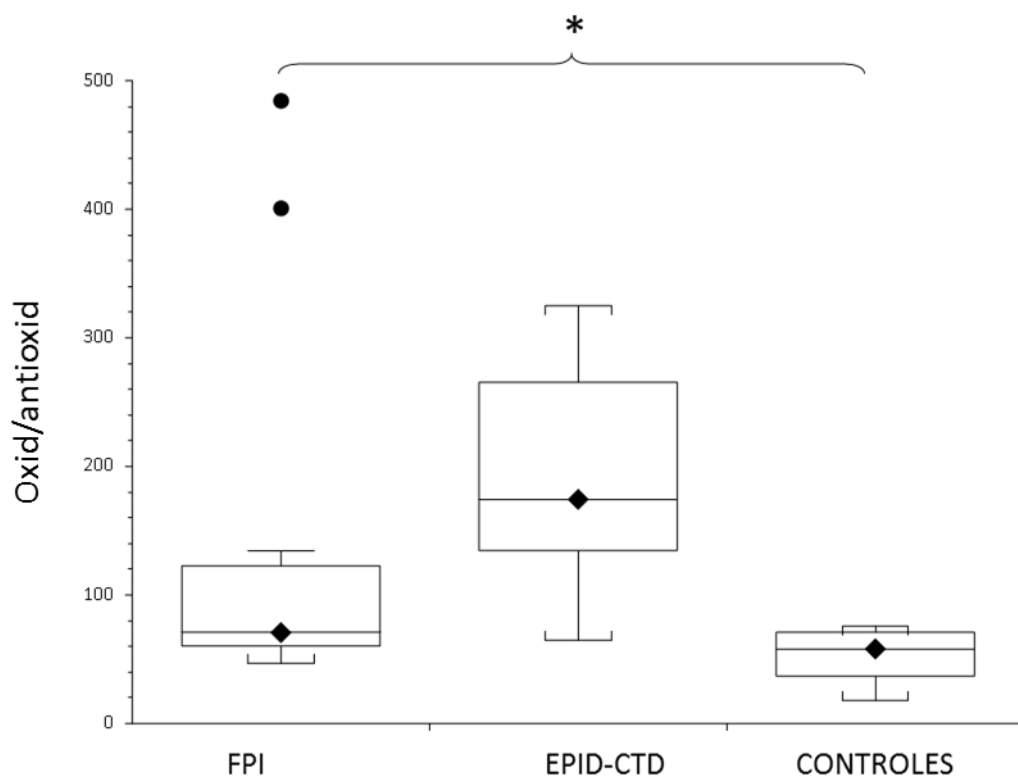


Figura 6. Cociente entre los productos resultantes de la oxidación y las defensas antioxidantes en los pacientes con FPI, EPID-CTD y en individuos sanos (controles) (* $P \leq 0,01$). Los círculos negros representan los valores atípicos extremos.

4.4. MMP-7 INCREMENTADA EN ENFERMOS DE EPID.

Se observaron niveles en sangre periférica más elevados de MMP-7 en enfermos que en sanos (Tabla XIV). Los niveles de MMP-7 en enfermos eran de $3,84 \pm 0,45$ ng/ml mientras que en sanos era de $1,40 \pm 0,15$ ng/ml ($P \leq 0,0001$) (Fig. 7).

Biomarcador	Enfermos	Control	P
MMP-7 ng/ml	$3,84 \pm 0,45$	$1,40 \pm 0,15$	$<0,0001$

Tabla VIIIIV. Niveles medios en sangre periférica de MMP-7 obtenidos en sujetos enfermos y sanos (controles).

Resultados

No se encontraron diferencias significativas entre FPI ($3,13 \pm 0,38$) y EPID-CTD ($5,14 \pm 1,23$) para las concentraciones de MMP-7 en sangre periférica, manteniéndose las diferencias significativas entre FPI y controles y EPID-CTD y controles (Fig. 7).

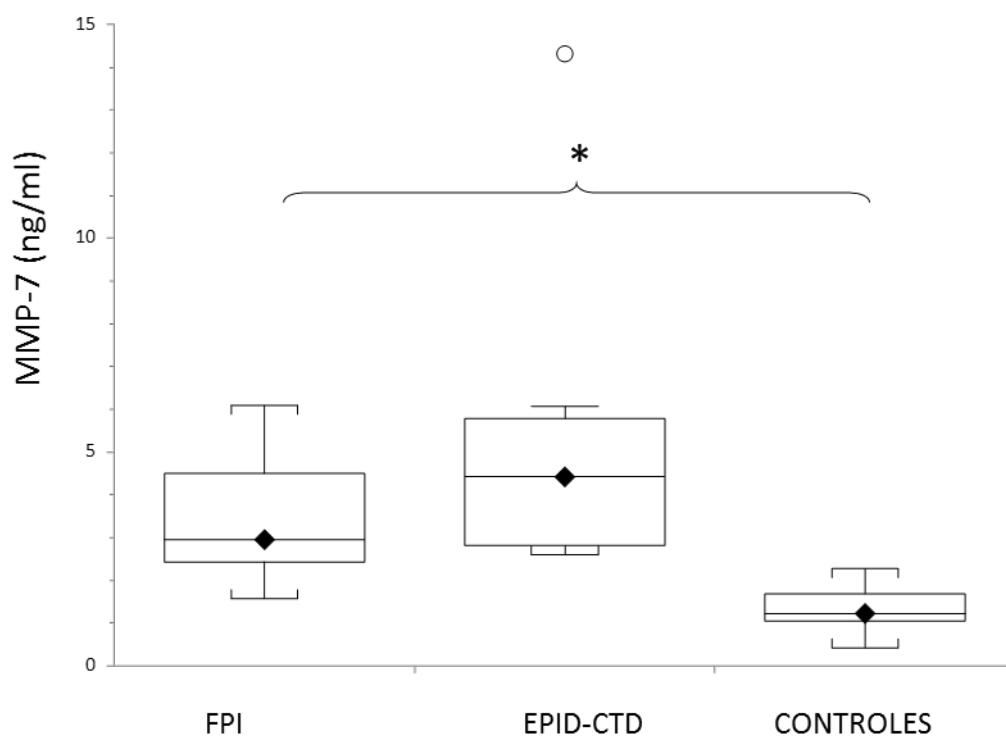


Figura 7. Niveles de MMP-7 en sujetos con FPI, EPID-CTD y controles. Los niveles son significativamente más altos en EPID-CTD y FPI que en controles ($P \leq 0,0001$). Los círculos blancos representan los valores atípicos leves y los círculos negros los valores atípicos extremos.

4.5. ANÁLISIS DE CURVAS ROC PARA DISCRIMINAR PACIENTES CON FPI Y EPID-CTD DE SANOS.

El análisis de las curvas ROC (del inglés *receiver operating characteristic curve*) se usó para evaluar la capacidad de discriminación de AGEs y AOPP séricos entre pacientes con FPI y EPID-CTD, de los sujetos sanos (controles).

4.5.1. CURVA ROC Y AGEs.

Para AGEs se estableció el punto óptimo de corte en 2370 UA. El área bajo la curva (AUC) (de sus siglas en inglés *area under the curve*) para AGE en FPI es de 0,78 (95% CI = 0,60-0,97). La sensibilidad y la especificidad fueron 71,43% (95% CI = 0,41-0,91) y 80% (95% CI = 0,44-0,97) respectivamente (Fig. 8).

AGEs para sujetos con EPID-CTD presenta un AUC de 0,95 (95% CI= 0,86-1). Las sensibilidad y especificidad para este marcador en EPID-CTD fueron 85,71% (95% CI = 0,42-0,99) y 80% (95% CI = 0,44-0,97), respectivamente (Fig. 8).

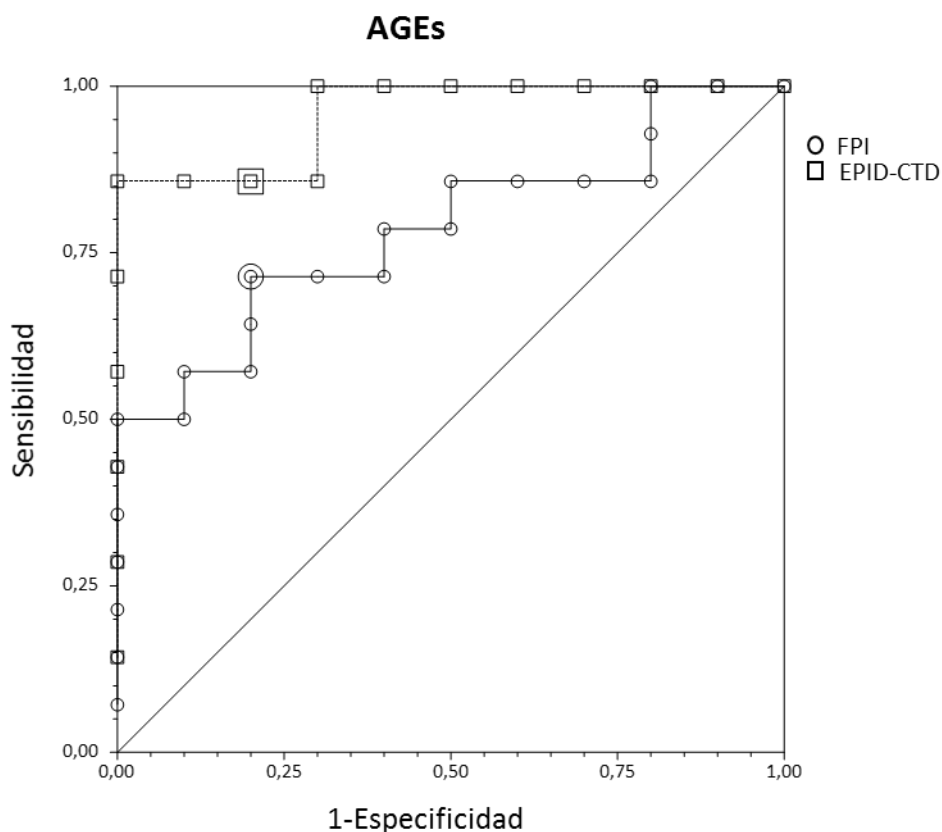


Figura 8. Poder discriminante de AGEs para diagnosticar entre pacientes con FPI y EPID-CTD de individuos sanos (controles). AUC FPI 0,78; AUC EPID-CTD 0,95.

4.5.2. CURVA ROC Y AOPP.

El AUC para la AOPP en sujetos con FPI fue de 0,80 (95% CI= 0,63-0,98). Se estableció el valor óptimo de corte AOPP en 202,461 μ M. La sensibilidad para diferenciar sujetos con FPI de sujetos sanos fue 83,33% (95% CI=0,51-0,97) y la especificidad 69,23% (95% CI= 0,38- 0,90) (Fig. 9).

AOPP para sujetos con EPID-CTD presentó un AUC de 0,71 (95% CI = 0,63-0,98). La sensibilidad y especificidad fueron 55,5% (95% CI= 0,21-0,86) y 69,23% (95% CI= 0,38-0,90), respectivamente (Fig. 9).

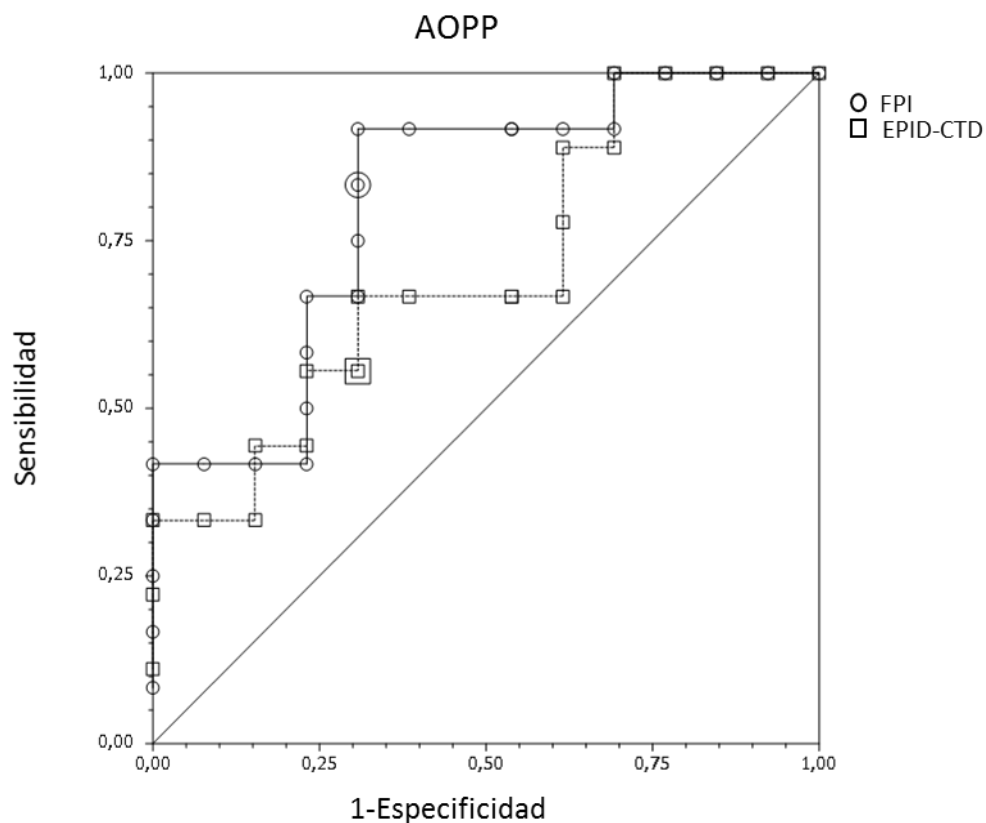


Figura 9. Poder discriminante de AOPP para diagnosticar entre pacientes con FPI y EPID-CTD de individuos sanos (controles). AUC FPI 0,80; AUC EPID-CTD 0,71.

4.5.3. CURVA ROC Y MMP-7.

El área bajo la curva para FPI y MMP-7 es 0,96 (95% CI = 0,91-1). Estableciendo el valor óptimo de MMP-7 en 2,07 ng/mL. La sensibilidad fue del 92,30% (95% CI= 0,63-0,99) y la especificidad del 92,86% (95% CI = 0,66 -0,99).

MMP-7 para sujetos con EPID-CTD presentó un AUC de 1 (95% CI = 1-1) mostrando una sensibilidad del 100% (95% CI= 0,66-1) y una especificidad del 92,85% (95% CI=0,66 - 0,99) (Fig. 10).

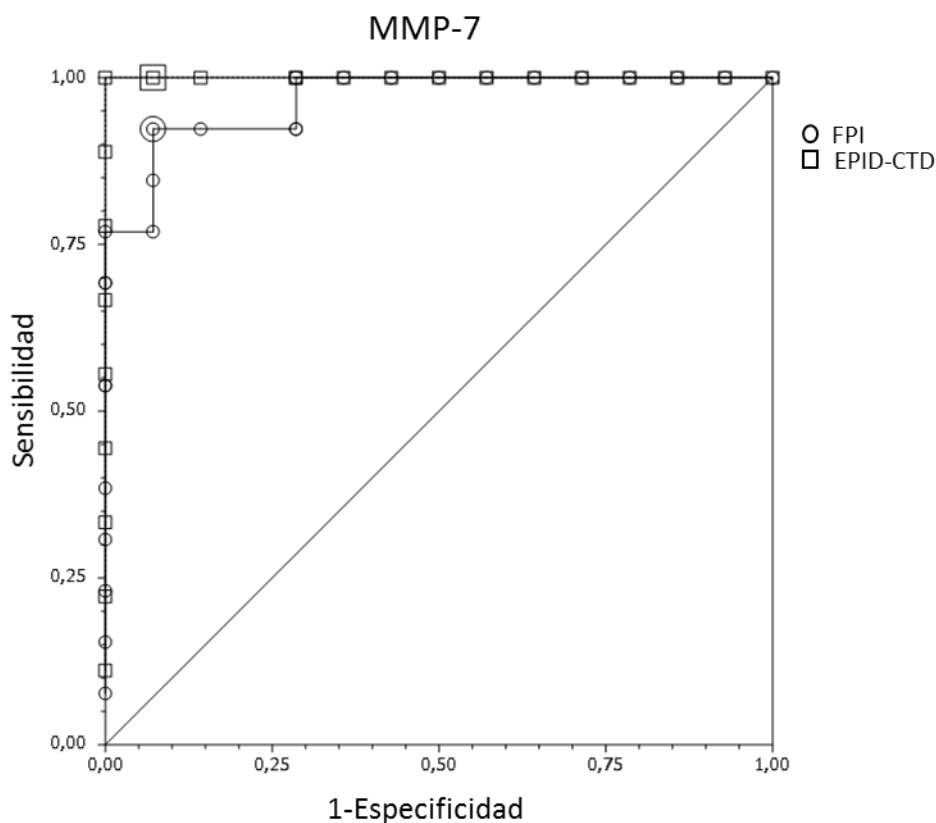


Figura 10. Poder discriminante de MMP-7 para diagnosticar entre pacientes con FPI y EPID-CTD de individuos sanos (controles). AUC FPI 0,96; AUC EPID-CTD 1.

4.6. RELACIÓN ENTRE LOS BIOMARCADORES SÉRICOS Y LA CLÍNICA DE LOS PACIENTES CON EPID.

No se ha encontrado relación entre los marcadores séricos de estrés oxidativo, las defensas antioxidantes y las variables clínicas expuestas anteriormente, en los epígrafes 4.1.1, 4.1.2. y 4.1.3., después del análisis estadístico descrito anteriormente.

Se exponen los resultados de la relación con la función pulmonar y la evolución del paciente. Se incluye la evolución del paciente ya que ésta contempla además del grado de disnea, el cambio en la función pulmonar y en la TACAR, parámetros hasta ahora más fiables en el seguimiento de los pacientes con EPID.

4.6.1. FACTORES SÉRICOS Y FUNCIÓN PULMONAR.

No se encontró ninguna relación entre la función respiratoria y los productos de la oxidación y/o las defensas antioxidantes.

Se dividieron a los pacientes en aquellos con FVC% superiores e inferiores al 55% (FVC% predicho) no apreciándose relación entre la función pulmonar y los niveles de los posibles biomarcadores (Tablas XV y XVI).

Producto resultante del impacto de ROS	FVC% ≥ 55%	FVC% < 55%	P
AGES (AU)	2912,83 ± 1362,30	2996,7 ± 1545,97	0,88
AOPP (μM)	347,65 ± 293,75	431,6 ± 350,42	0,49

Tabla XV. Valores medios (± ESM) de los productos de oxidación atendiendo a la capacidad pulmonar evaluada por el FVC%.

Antioxidantes	FVC% ≥ 55%	FVC% < 55%	P
Tioles totales μM	93,03 ± 24,88	87,63 ± 24,13	0,57
TAS mM	1,63 ± 0,19	1,76 ± 0,32	0,21
EC-SOD ng/ml	225,84 ± 144,55	232,49 ± 142,57	0,90
OX/antiox	89,32 ± 99,59	161,96 ± 132,81	0,13

Tabla XVI. Valores medios (± ESM) de las defensas antioxidantes y del cociente entre los productos de oxidación y antioxidantes, atendiendo a la capacidad pulmonar evaluada por el FVC%.

Resultados

Tampoco se observaron diferencias en los marcadores de estrés oxidativos al dividir a los pacientes en dos grupos atendiendo a la disminución de DLCO % menor y mayor del 45%. (Tablas XVII y XVIII).

Producto resultante del impacto de ROS	DLCO% ≥ 45%	DLCO% < 45%	P
AGES (AU)	3057,92 ± 1494,09	2843 ± 1362,67	0,69
AOPP μM	316,51 ± 241,28	430,66 ± 360,66	0,34

Tabla IX. Valores medios (± ESM) de los productos de oxidación atendiendo a la capacidad de difusión del monóxido de carbono (DLCO %).

Antioxidantes	DLCO% ≥ 45%	DLCO% <45%	P
Tioles totales μM	97,68 ± 25,31	85,53 ± 22,80	0,18
TAS mM	1,76 ± 0,20	1,77 ± 0,28	0,94
EC-SOD ng/ml	236,18 ± 156,81	222,02 ± 132,24	0,79
OX/antiox	80,65 ± 64,58	147,40 ± 140,04	0,17

Tabla XVIII. Valores medios (± ESM) de las defensas antioxidantes y del cociente entre los productos de oxidación y antioxidantes, a la capacidad de difusión del monóxido de carbono (DLCO %).

Del mismo modo que para los marcadores anteriores, los niveles séricos de MMP-7 no se relacionaron con la función pulmonar (Tablas XIX y XX).

Resultados

	FVC% ≥ 55%	FVC% < 55%	P
MMP-7 ng/mL	4,29 ± 3,06	3,07 ± 0,97	0,21

Tabla XIX. Valores medios (± ESM) de MMP-7, atendiendo a la capacidad pulmonar evaluada por el FVC%.

	DLCO% ≥ 45%	DLCO% ≤45%	P
MMP-7ng/ml	3.54 ± 1,44	4,07 ± 2,99	0,57

Tabla XX. Valores medios (± ESM) de MMP-7, atendiendo a la capacidad de difusión del monóxido de carbono (DLCO%).

4.6.2. FACTORES SÉRICOS Y EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD.

Se estudió la relación de cada uno de los posibles biomarcadores de estrés oxidativo y las defensas antioxidantes con la evolución que presentaban los pacientes, de tal forma que se establecieron tres grupos, sujetos que presentaban ligera mejoría, se mantenían estables o presentaban empeoramiento, no encontrándose relación entre la evolución de la enfermedad y los distintos factores de estrés oxidativo (Tablas XXI y XXII).

Los tres niveles en la evolución objetiva de la enfermedad se obtuvieron teniendo en cuenta los criterios de la ATS/ERS (177) establecidos para la FPI que son aplicables a las EPID. Para ellos se tienen en cuenta el grado de disnea y los cambios en los volúmenes pulmonares, saturación de oxígeno y la TACAR.

Resultados

	Mejoría	Estable	Empeoramiento	P
AGEs (UA)	2568,5 ± 106,5	2903,43 ± 416,80	3076,38 ± 366,27	0,75
AOPP μM	278,4 ± 49,5	563,58 ± 99,22	280,05 ± 29,6	0,16

Tabla XXI. Valores medios (\pm ESM) de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo medidos en sangre periférica atendiendo a la evolución del paciente.

	Mejoría	Estable	Empeoramiento	P
EC-SOD ng/mL	193,71 ± 71,11	244,25 ± 40,03	226,93 ± 35,56	0,77
Tioles totales μM	95,3 ± 0,5	91,9 ± 6,29	88,21 ± 7,2	0,88
TAS mM	2,1 ± 0,01	1,76 ± 0,01	1,77 ± 0,01	0,32
Oxi/antiOx	85,10 ± 24,45	170,33 ± 49,22	99,44 ± 19,56	0,35

Tabla XXII. Valores medios (\pm ESM) de los parámetros relacionados con las defensas antioxidantes medidos en sangre periférica atendiendo a la evolución del paciente.

En el caso de las MMP-7 aunque no existieron diferencias estadísticamente significativas, se aprecia un leve incremento a medida que se produce un deterioro en la clínica del paciente (Tabla XXIII).

Metaloproteasas	Mejoría	Estable	Empeoramiento	P
MMP-7 ng/ml	1,72 ± 0,73	3,85 ± 1,85	4,13 ± 3,09	0,14

Tabla XXIII. Valores medios (\pm ESM) de MMP-7 atendiendo a la evolución del paciente.

5. DISCUSIÓN

5.1. GENERALIDADES

Las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades pulmonares que afectan al intersticio pulmonar, así como a las células epiteliales alveolares, las pequeñas vías respiratorias y la vasculatura pulmonar. La causa de las EPID es ampliamente variada, incluyendo desde patologías producidas por tóxicos inhalados, enfermedades asociadas a patología del tejido conjuntivo o fibrosis idiopática.

El consenso de la ATS/ERS (48) para las EPID ha sido una herramienta que ha ayudado a clasificar con mayor precisión este tipo de patologías. Sin embargo, entre los desafíos que plantea el manejo de las EPID se incluye la superposición sustancial de las características clínicas, radiológicas e histológicas entre las diferentes entidades, la amplia variabilidad del curso clínico y las limitadas opciones terapéuticas (178,179)

Los datos clínicos, radiológicos, en concreto los obtenidos por tomografía computarizada de alta resolución (TACAR) y la histológica, son necesarios para alcanzar un diagnóstico definitivo, establecido por un equipo multidisciplinar compuesto por radiólogos, anatomopatólogos y neumólogos expertos en EPID. En al menos un 10% de los casos, a pesar de disponer de una biopsia pulmonar y un equipo multidisciplinar experimentado la enfermedad es clasificable, con características superpuestas de diferentes tipos de EPID. Además, la realización de una biopsia quirúrgica de pulmón no siempre es posible, dada la edad avanzada de los pacientes, a los que se les asocia con frecuencia comorbilidades que contraindican la realización de dicha prueba(179).

Las incertidumbres con respecto al diagnóstico pueden traducirse en grandes incertidumbres en la gestión. Esto es particularmente relevante ahora que existen tratamientos específicos para los pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (FPI) (180), por lo que se plantean a menudo conflictos en el manejo de las EPID, con problemas diagnósticos y dilemas terapéuticos (48).

La identificación de biomarcadores en suero que tengan valor diagnóstico y pronóstico en las EPID es de gran importancia, particularmente en los casos en que no se puede realizar una biopsia pulmonar quirúrgica o este contraindicada y las imágenes de

TACAR no sean totalmente concluyentes para la filiación de la enfermedad (181-183). Se ha examinado una gran variedad de biomarcadores de estas enfermedades respiratorias (184,185) analizándose moléculas en el tejido pulmonar, en el BAL y en sangre periférica como potenciales biomarcadores. Entre las moléculas más estudiadas se incluyen las implicadas en la formación y remodelación de la matriz, en el metabolismo del epitelio alveolar y en procesos inmunológicos (181) sin que se hayan podido incluir, actualmente, en la práctica clínica habitual de los pacientes con EPID.

Como se ha comentado previamente, las EPID se caracterizan por un depósito excesivo de las proteínas de la matriz extracelular (ECM) en el intersticio pulmonar, con un epitelio alveolar dañado, y un incremento de células mesenquimatosas activadas, los miofibroblastos. La patogenia de estas alteraciones y de la fibrosis subyacente incluye múltiples mecanismos moleculares, siendo el estrés oxidativo un importante factor en la patogenia de la fibrosis que se produce en las EPID (186).

La fibrosis pulmonar se asocia con el desequilibrio redox y al estrés oxidativo (187), donde las especies reactivas de oxígeno (ROS) regulan los fenotipos y los mecanismos celulares, incluyendo la diferenciación, la apoptosis, la migración y la invasión durante la reparación de los tejidos (101). Muchos de estos mecanismos pueden contribuir a una regulación anormal de reparación, que se asocian con la fibrosis pulmonar.

Como se ha referido en los objetivos de este trabajo, se evaluaron los factores involucrados en el estrés oxidativo como posibles biomarcadores para distinguir entre pacientes de EPID e individuos sanos y entre FPI, neumonía intersticial no específica (NINE) y enfermedad pulmonar intersticial difusa asociada a conectivopatías (EPID-CTD). Así se han medido en sangre los productos resultantes del impacto de ROS (dos resultantes de la oxidación de proteínas y dos resultantes de la oxidación lipídica) y factores antioxidantes en pacientes bien caracterizados de FPI, NINE y EPID-CTD.

Se eligieron estas patologías debido por un lado a la importancia de identificar los enfermos con FPI, por la incorporación a su tratamiento de Pirfenidona y Nintedanib y por la documentación de los efectos negativos de la inmunosupresión combinada en esta población (180). Además, el diagnóstico de FPI requiere la exclusión de todas las causas conocidas. La TACAR es esencial para el diagnóstico de FPI(48), se asocia a un patrón radiológico e histológico de neumonía intersticial usual (48). Dado que éste

no es patognomónico, el diagnóstico de FPI requiere la exclusión de otros tipos de enfermedades pulmonares intersticiales como las EPID-CTD. Además, la FPI debe diferenciarse de otras enfermedades pulmonares parenquimatosas, incluyendo la NINE (188). La exclusión de EPID-CTD es también relevante, ya que a veces el patrón de fibrosis pulmonar antecede a las manifestaciones de la enfermedad del tejido conjuntivo.

En resumen, se evalúan como posibles biomarcadores aquellos factores relacionados con el desequilibrio redox observado en EPID. Se plantean el estudio de los siguientes:

- Biomarcadores resultantes del impacto de ROS. Aquí se incluyen los biomarcadores que miden directamente el impacto químico de ROS en los sistemas biológicos. Se estudian:
 - Productos finales de la glicación avanzada (AGEs).
 - Productos de la oxidación avanzada de las proteínas (AOPPs).
 - Productos de la oxidación de lípidos:
 - Hidroperóxidos de lípidos (LOOH).
 - Productos finales de la peroxidación de lípidos. Mediante la reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) (113).
- Biomarcadores de defensa antioxidante:
 - Tioles totales.
 - Superoxido dismutasa extracelular (EC-SOD).
 - Actividad total antioxidante (TAS).

5.2. PRODUCTOS RESULTANTES DEL IMPACTO DE LOS ROS. VALORES SÉRICOS EN FPI Y EPID-CTD.

5.2.1. NIVELES DE AGEs SUPERIORES EN PACIENTES CON FPI Y EPID-CTD.

Este estudio es el primero en evaluar los niveles séricos de AGEs como posible biomarcador de estrés oxidativo en pacientes con EPID, incluyendo pacientes con FPI, NINE y EPID-CTD. Se ha comprobado como los niveles séricos estaban elevados de forma significativa en los pacientes con EPID, con un incremento del 56.59%, respecto a los individuos sanos.

En este estudio y por primera vez se ha comprobado que AGEs en los pacientes EPID-CTD tenían valores más altos, con un incremento de un 43.59%, que los sujetos con FPI. Los pacientes con FPI seguían teniendo valores significativamente más altos que los controles.

Como se ha comentado con anterioridad se pretendió conocer también si los AGEs mostraban diferencias en los tres tipos de patologías motivo de estudio. Los pacientes de NINE no se incluyeron finalmente en el estudio debido a defectos en el procesamiento de las muestras de sangre.

Aunque se cree que la enfermedad pulmonar intersticial se desarrolla más tarde que la conectivopatía, a veces, la manifestación pulmonar es la primera presentación. La diferencia de ambas patologías por AGEs es, por tanto, importante ya que aunque las EPID-CTD presentan similitudes en la presentación clínica y patológica, el pronóstico y el tratamiento difiere de las de otras formas de EPID, como la FPI (189).

Existen datos previos de los niveles elevados de AGE y su receptor RAGE en pacientes con FPI pero no en EPID-CTD. Así, de forma similar, en pacientes diagnosticados de FPI se observó un incremento de AGEs comparados con los individuos sanos (122). En este mismo estudio no se encontraron diferencias significativas entre pacientes con FPI y NINE, ni entre NINE y sanos (122).

Discusión

También se han encontrado niveles elevados de AGEs en el parénquima pulmonar de pacientes con FPI (190). Los dos estudios de Kyung (122) y de Machahua (190) miden igualmente los niveles de RAGE y concluyen que la interacción AGE-RAGE puede jugar un papel muy importante en el desarrollo de la fibrosis pulmonar.

Nuestra investigación encuentra diferencias entre EPID-CTD y controles y entre EPID-CTD y FPI. Hasta ahora, no se han encontrado otros datos publicados equivalentes, ni en sangre, ni en el lavado broncoalveolar (BAL) ni en el parénquima pulmonar.

Si es evidente, sin embargo, el papel de AGEs en las conectivopatías, ya que pueden afectar dramáticamente las propiedades del colágeno (191,192) y juegan también un papel importante en el trastorno autoinmune que acompaña a numerosos cuadros de artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico (193).

Las conectivopatías más comunes con manifestaciones pulmonares son la artritis reumatoide (AR), la esclerodermia o esclerosis sistémica, el síndrome de Sjögren, la polimiositis, dermatomiositis y el lupus eritematoso sistémico. En este estudio se incluyeron pacientes con esclerodermia (10%) y con AR (90%).

Existen investigaciones que han medido AGEs en suero de pacientes con conectivopatías, pero sin que se refiera daño pulmonar asociado. Así en AR se ha comprobado que AGE y su receptor, están elevado en sangre (194). Se han encontrado igualmente niveles de AGE más elevados en pacientes con AR que en los que cursaban con osteoartritis o pacientes diabéticos tanto en sangre como en líquido sinovial(195). Igualmente, en suero de pacientes con AR se encontraron niveles altos de AGEs cuando se compararon con individuos sanos y con pacientes con lupus eritematoso diseminado(196).

La expresión del receptor de RAGE en el tejido sinovial de pacientes afectados de AR apoya la idea de que AGEs y RAGE pueden contribuir a la progresión de la disfunción celular en pacientes con este trastorno autoinmune del tejido conectivo(197,198). Las nuevas evidencias de la importancia de AGE y su receptor RAGE en la fisiopatología de la AR hace que se piense en la asociación AGE/RAGE como diana terapéutica para esta enfermedad(199).

Igualmente, existen datos del incremento de AGEs en el suero de los pacientes con esclerosis sistémica en comparación con individuos sanos (200-203). Así estudios *in*

vivo e in vitro han demostrado que el tratamiento con bloqueadores de los canales de calcio, especialmente del tipo dihidropiridina (nifedipina) reducen los niveles de marcadores de estrés oxidativo, incluidos AGEs, en pacientes con esclerosis sistémica (200). Se encontró en estos pacientes una mayor acumulación de productos de AGE en la piel en comparación con los individuos sanos (204). Además en estos pacientes se puso de manifiesto el posible papel de AGE en la predicción de la aterosclerosis temprana o eventos cardiovasculares de estos pacientes (204).

El incremento de AGEs encontrado en nuestro estudio en EPID-CTD comparado con los pacientes con FPI puede deberse a las conocidas alteraciones del colágeno propias de estas patologías, propiciadas por la acumulación de AGEs y por el incremento de AGEs en enfermedades autoinmunes (191,193).

El daño oxidativo mediado por especies de oxígeno reactivo, en las enfermedades autoinmunes, da lugar a la generación de subproductos que modifican proteínas y éstas proteínas modificadas por estas moléculas son mediadores importantes de la toxicidad celular y la patogénesis de la enfermedad. Los productos aldehídicos, principalmente, forman aductos con proteínas y los hacen altamente inmunogénicos. Se ha demostrado que las proteínas modificadas de esta manera inducen anticuerpos patógenos en una variedad de enfermedades incluyendo el lupus eritematoso sistémico y la AR (193). Los estudios en pacientes con enfermedades reumáticas revelaron anticuerpos IgM frente a IgG glicada. Estudios anteriores han demostrado que los AGEs se elevaron en el 50% de los pacientes con AR y que estos niveles aumentados se correlacionaron con la actividad de la enfermedad clínica (193).

El incremento encontrado en los pacientes con EPID-CTD ha de completarse con aquellos que establezcan comparaciones con las mismas enfermedades del tejido conjuntivo y autoinmunes sin afectación pulmonar.

5.2.2. NIVELES DE AOPP AUMENTADOS EN LOS PACIENTES DE EPID.

El AGE no es el único biomarcador oxidante aumentado en nuestros resultados, también los productos de la oxidación avanzada de las proteínas (AOPP) mostraron una concentración en sangre periférica de los sujetos con EPID significativamente más alta que en los sanos. En este caso el incremento fue del 146.82%. No se

establecieron diferencias en el análisis entre los pacientes de FPI y EPID-CTD.

Aunque existen escasos datos en la literatura sobre los niveles de AOPP en EPID, de igual forma que en nuestro trabajo, se han encontrado niveles séricos aumentados de AOPP en pacientes con esclerosis sistémica con alteración pulmonar. Se apreció un incremento marcado de AOPP en pacientes con afectación pulmonar mayor que en aquellos sin afectación pulmonar (141). Igualmente, y en pacientes afectados de poliangeítis microscópica con compromiso pulmonar se observó un incremento de AOPP, e igualmente se relaciono con el estrés oxidativo observándose una relación entre los niveles de AOPP, la producción de HOCl y la proliferación de fibroblastos, además esto solo ocurría en los pacientes con compromiso pulmonar.

Existen trabajos que hacen referencia a los niveles incrementados de AOPP en animales de experimentación en los que se les indujo una fibrosis pulmonar después de exponerlos a ROS (HOCl o $\text{OH}\cdot$). En este caso se propone que el incremento de AOPP se debe al incremento de ROS, ya que sus niveles fueron más altos que los observados en la fibrosis pulmonar inducida por Bleomicina (141).

Igualmente, y en modelos murinos de FPI producida por Bleomicina se ha comprobado un incremento sérico de AOPP. En este mismo modelo al administrar Leflunomida, un agente inmunomodulador antiproliferativo usado en el tratamiento de la AR, se observo un descenso marcado de los niveles de AOPP, similares a los animales controles (205).

Es por tanto nuestro trabajo uno de los pocos que evalúa los niveles de AOPP en diferentes tipos de EPID.

5.2.3. LOS PRODUCTOS DE OXIDACIÓN DE LÍPIDOS NO ESTAN ELEVADOS EN LOS PACIENTES DE EPID.

A pesar de que se podría esperar un incremento del producto de la peroxidación lipídica en nuestros pacientes no se han encontrado diferencias significativas entre los niveles del LOOH ni de TBARS entre pacientes e individuos sanos

Existen pocos datos sobre la expresión de productos de lipoperoxidación en pacientes con EPID y solo se refieren a FPI. Así se han analizado los niveles plasmáticos de los productos de peroxidación medidos como TBARS en 12 pacientes con FPI, encontrándose elevados respecto a los sujetos sanos (102). Igualmente en otra serie de 57 pacientes con FPI, TBARS se encontraron elevados en suero al compararlos con individuos sanos (206).

Existen más datos aunque en modelos murinos de fibrosis pulmonar donde los lipoperoxidos se miden como reflejo del estrés oxidativo. Así en estos ratones con fibrosis pulmonar inducida por Bleomicina se ha observado que los niveles de lipoperoxidos en el tejido pulmonar descienden al usar fármacos antifibroticos inhibidores de la óxido nítrico sintetasa (207). Del mismo modo y en este modelo animal la Bleomicina incrementa en sangre los niveles de lipoperoxidos que igualmente descienden después del tratamiento con un inhibidor del NF- κ B (208). Igualmente en fibrosis pulmonar inducida por tetracloruro de carbono, CCl₄, tras el tratamiento con un antioxidante como la S-alil cisteína, los lipoperoxidos eran marcadores del descenso de la fibrosis(209).

En nuestros pacientes, LOOH y TBARs, como se ha comentado anteriormente, no se modifican y se podría justificar, como consecuencia de un aumento de los enzimas que participan en el metabolismo del radical superoxido y LOOH. Estas enzimas son la superoxido dismutasa (SOD), que llevaría a una dismutación del radical superoxido a agua oxigenada y la glutatión peroxidasa (GPX) que dextoxifica el agua oxigenada a agua. La GPX es también la enzima principal en la reducción y el metabolismo de los hidroperóxidos lípidicos con consumo de glutatión (GSH)(210). Por tanto el aumento de SOD junto con el posible aumento de la GPX y su cofactor GSH podrían ser los responsables del catabolismo de estas sustancias. No se ha medido en nuestro caso GSH, pero probablemente esté incrementado por el tratamiento con Acetilcisteina (ACC).

No podría igualmente excluirse que en una fase inicial, los LOOH y TBARS sean unas de las sustancias mediadoras en la activación y la transformación de los fibroblastos. Estas mismas sustancias activan los genes implicados en la síntesis de enzimas para la síntesis del GSH y otras enzimas detoxificadoras dependientes del GSH (211). En estos enfermos se han medido LOOH y TBARs después de un tiempo medio de seguimiento de más de tres años.

No ocurre lo mismo con las AOPP que derivan de la oxidación mediante ROS/RNS, y HCLO (derivado de PMN), que se encuentran implicados directamente en la patogénesis de la FPI.

Ninguno de los productos resultantes del impacto de las ROS medidos en sangre se relacionó con los valores pulmonares de los pacientes motivo de estudio ni con otras variables clínicas.

5.3. ANITOXIDANTES Y EPID.

5.3.1. TIOLES TOTALES MÁS ALTOS EN PACIENTES QUE EN LOS INDIVIDUOS SANOS. TIOLES TOTALES Y TRATAMIENTO CON ACETILCISTEINA.

En nuestros pacientes, afectados con EPID, se encontró un incremento significativo del 21,26% de tioles totales en sangre periférica, respecto a los sanos. Se consideró el tratamiento con ACC y solo aquellos pacientes tratados son los que mantuvieron diferencias significativas con los sanos, por lo que el incremento se atribuyó a incluir este tratamiento, ya que aquellos que no la tomaron no mostraron ninguna diferencia con los individuos sanos. El incremento para los que tomaban ACC fue del 32% respecto a los sanos. Cuando se consideraron las diferentes opciones terapéuticas solas o combinadas con ACC no se encontraron diferencias en la capacidad antioxidante mediada como tioles totales en suero.

La ACC puede no sólo provocar la eliminación directa de estos oxiradicales reactivos, sino que también puede ejercer actividad antifibrótica al inhibir la producción de citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (212). También se reconoce generalmente que tiene la capacidad de mejorar el desequilibrio redox mediante la transformación metabólica en el antioxidante glutatión. Sin embargo, existen estudios y opiniones contradictorias respecto al uso de ACC en los pacientes con EPID.

El cambio en la capacidad vital forzada (FVC) o la capacidad vital (CV) actualmente representa un punto final altamente fiable en el tratamiento de la FPI. El ensayo IFIGENIA, demostró diferencias significativas entre un régimen de tres fármacos (ACC oral 600 mg tres veces al día, añadido a un régimen estándar de Prednisona y Azatioprina) y un régimen estándar de dos fármacos (Prednisona + Azatioprina), con respecto al deterioro de la CV y la capacidad de difusión del monóxido de carbono (DLCO) (61). Por otro lado, en el ensayo PANTHER-IPF, publicado en 2014 no se observó diferencia significativa en el cambio de la FVC entre el grupo tratado con ACC oral y el grupo placebo (213). Por lo tanto, la eficacia de la terapia con ACC oral en pacientes con FPI sigue siendo controvertida.

En nuestro caso no se han encontrado diferencias del tratamiento con ACC y la FVC ni la DLCO, pero si se puede asegurar que la cisteína incrementó los niveles totales de tioles. Se puede considerar como ocurre en modelos murinos, en los que se induce fibrosis pulmonar por Bleomicina(214), que en aquellos pacientes tratados con ACC puede aumentar una de las defensas antioxidantes

Como en los tioles totales la medida del estado de antioxidantes totales (TAS) también sufrió un incremento en los pacientes enfermos respecto a los sanos, sin que en estos influyese el tratamiento con ACC.

5.3.2. NIVELES DE EC-SOD AUMENTADOS EN SANGRE. POLIMORFISMO DE EC-SOD.

En nuestro trabajo, se aprecia un aumento significativo de la concentración másica de EC-SOD expresada en ng/mL en los sujetos enfermos de EPID, sin que existan diferencias significativas entre los enfermos de FPI y EPID-CTD. El incremento medio es del 59.48 % en los pacientes con EPID. Igualmente, se midió la actividad enzimática de EC-SOD (U/ml) y en este caso no se observaron diferencias entre pacientes y personas sanas.

Se conoce que en los enfermos afectados de FPI se produce un agotamiento de EC-SOD del parénquima pulmonar, provocando una acumulación de EC-SOD proteolizada en el BAL de los sujetos enfermos(163), en nuestro caso este aumento se ha documentado en sangre periférica.

En otros trabajos se ha puesto de manifiesto que la EC-SOD se encuentra a altos niveles en la matriz extracelular de los alvéolos pulmonares debido a su dominio de unión a la heparina. Esta unión es especialmente sensible a la proteólisis, resultando en un aclaramiento de EC-SOD en la matriz. En animales de experimentación donde se ha provocado la fibrosis se ha observado la disminución de la proteína y la actividad de EC-SOD en el parénquima pulmonar, mientras que los niveles de EC-SOD estaban elevados en el BAL. La EC-SOD en el BAL fue predominantemente en la forma proteolizada, la cual carece del dominio de unión a heparina. Estos datos sugieren que ante una agresión pulmonar, las reacciones de estrés oxidativo, provocan una mayor proteólisis y el aclaramiento del EC-SOD del parénquima pulmonar a la vía aérea, así el agotamiento de EC-SOD de la matriz extracelular puede aumentar la susceptibilidad de los pulmones al estrés oxidativo (163).

Recientemente, en el 2016, Westergren-Thorsson(215) ha puesto de manifiesto como en pacientes con FPI la cantidad y la estructura de los glicosaminoglicanos se alteran. Así el glucosaminoglucano heparan sulfato altera su composición con una proporción aumentada de disacáridos 2-O, 6-O, creando un paisaje de ECM pro-fibrótico (215).

También la disminución de EC-SOD en el parénquima pulmonar podría deberse a los polimorfismos que pueden observarse en la fibrosis pulmonar. Así se ha demostrado en los pacientes con FPI donde los polimorfismos de EC-SOD disminuyen su capacidad de unión al parénquima pulmonar y disminuyen su capacidad oxidante.

Una alteración que se produce en la EC-SOD es el polimorfismo Arg213Gly (rs 8192291), una sustitución de la arginina por la glicina (Gly) en el dominio de unión a la heparina de la EC-SOD(216). Los individuos con la variante Gly tienen un nivel de EC-SOD más alto en el suero y un mayor riesgo de estrés oxidativo(217).

Para conocer si nuestros pacientes tenían alterada la EC-SOD se han llevado a cabo experimentos adicionales para investigar si el polimorfismo Arg213Gly de EC-SOD, que conduce a la unión disminuida de tejido de EC-SOD, se asociaba a EPID. No se encontró este polimorfismo en los pacientes de este estudio.

No se justifica, en nuestro estudio, el incremento de la concentración másica de EC-SOD por el polimorfismo. Sin embargo, y como se ha comentado anteriormente, si se conoce que EC-SOD se une a los glucosaminoglucanos de la matriz extracelular y la alteración en el proceso fibrótico modifica la estructura de la unión de EC-SOD con

heparán sulfato, descendiendo los niveles pulmonares y aumentando la EC-SOD proteolizada en el BAL de los sujetos enfermos (215).

Al no estar incrementada la actividad enzimática de EC-SOD en nuestros pacientes ni tampoco observarse polimorfismos para EC-SOD, el incremento puede deberse a alteraciones en el parénquima pulmonar del heparán sulfato que se une a EC-SOD.

5.3.3. BALANCE FINAL ENTRE LOS PRODUCTOS RESULTANTES DE LA OXIDACIÓN/ANTIOXIDANTES. BALANCE INCREMENTADO EN LOS ENFERMOS DE EPID.

Aunque encontramos incrementados en los pacientes con EPID las defensas antioxidantes medidas en sangre periférica, también se incrementaron significativamente los productos derivados del estrés oxidativo. Por eso se realizó el cociente entre los productos de oxidación y las defensas antioxidantes.

El equilibrio redox dentro de los tejidos o en la circulación se debe a una homeostasis fuertemente regulada entre las capacidades oxidantes y antioxidantes. Mediante la evaluación de la relación OX/AntiOX, es decir, la relación entre los productos derivados de daño oxidativo (OX) como AGE, AOPP y TBARS y los productos antioxidantes o antiOX (TAS, tioles totales, EC-SOD en U/ml) se aprecia un claro y significativo desbalance en los pacientes de EPID. Existe un significativo incremento del cociente en los enfermos respecto a los controles, por lo que en los pacientes con EPID se produce un incremento del estrés oxidativo, aunque se incrementen los valores medios de las defensas antioxidantes medidas en suero, cuando se miden de forma separada.

Este balance ya realizado previamente en otros estudios (172) donde se valora los productos de oxidación y los antioxidantes, es de gran utilidad, ya que un solo marcador de estrés oxidativo no da una valoración objetiva, en cuanto al balance final redox.

Nuestros resultados muestran, como esta descrito en la patogenia de la enfermedad, que el estrés oxidativo interviene en la fibrosis pulmonar (101) y esta incrementado en los pacientes con EPID. En este caso el valor como posibles biomarcadores de los

productos de la oxidación que se produce en estas patologías, y que se analiza en el apartado 5.5, cobra aún más relevancia.

Igual que ocurría en los productos resultantes del impacto de los ROS medidos en sangre, las defensas antioxidantes no se relacionaron con los valores pulmonares de los pacientes motivo de estudio ni con otras variables clínicas, con la excepción de los tiosoles y el tratamiento con ACC.

5.4. METALOPROTEASA 7 INCREMENTADA EN LOS PACIENTES DE EPID.

En nuestro estudio los niveles en suero de la metaloproteasa 7 (MMP-7) estaban elevados en los pacientes con EPID. El incremento fue de un 30.71% en los enfermos respecto a los sanos. No se apreciaron diferencias en los niveles de MPP-7 entre los enfermos de FPI y EPID-CTD.

Igual que en nuestro estudio, en EPID y especialmente en FPI se han encontrado niveles elevados de MMP-7 (218). Morais en 2015 (219) midió los niveles en suero de MMP-7, encontrando la MMP-7 incrementada en FPI, sin que hubiese diferencias entre pacientes con FPI y los afectados de sarcoidosis.

En cuanto a los niveles incrementados en EPID-CTD existen estudios que han puesto de manifiesto niveles séricos de MMP-7 más elevados en AR con compromiso pulmonar que en ausencia de enfermedad pulmonar (220). Igualmente, en dos cohortes con un total de 85 pacientes con AR y enfermedad pulmonar se ha observado que MMP-7 estaba elevada respecto a los que no tenían alteración pulmonar (85).

Hasta ahora y solo en un trabajo reciente con 63 enfermos con FPI, 33 pacientes con EPIP asociada a AR y 41 pacientes con otro tipo de EPID, MMP-7 distinguió FPI de otros tipos de EPID, pero no diferenciaba a los pacientes diagnosticados de AR (180).

Como se discutirá posteriormente MMP-7 ha sido considerado un posible biomarcador en EPID y una de los más estudiados debido al papel en los procesos fibróticos. Solo se le ha identificado como marcador diagnóstico ya que no se pudo obtener una relación entre los niveles séricos de MMP-7 y la clínica de los pacientes.

5.5. POSIBLES BIOMARCADORES DE EPID. AGE, AOPP Y MMP-7.

Se proponen en este trabajo como biomarcadores de estrés oxidativo capaces de diferenciar pacientes de FPI y EPID-CTD de pacientes sanos a AGEs y MMP-7, ya que tienen una alta sensibilidad y especificidad para diferenciar ambas patologías de los individuos sanos. Atendiendo a su sensibilidad y especificidad AOPP, solo es útil para los pacientes afectados de FPI.

AGE es un buen marcador de estrés oxidativo para diferenciar enfermos de EPID e individuos sanos, pero también para distinguir entre FPI y EPID-CTD como se ha comentado anteriormente. El análisis de las curvas ROC que se usó para evaluar la capacidad de discriminación de niveles séricos de AGEs entre pacientes con FPI y con EPID-CTD, de sujetos sanos (controles) dio para FPI 0,78 (95% CI = 0,60-0,97) y para EPID-CTD 0,95 (95% CI=0,86-1). El punto de corte se estableció en 2370UA por encima del valor medio de los controles.

Como se ha comentado en el apartado 5.2.1. los valores de AGEs fueron superiores en los pacientes con EPID-CTD, por lo que AGEs puede diferenciar ambas patologías, siendo el único marcador estudiado que establece un diagnóstico diferencial entre FPI y EPID-CTD.

La sensibilidad y especificidad para distinguir FPI de controles fueron 71,43% y 80%, respectivamente y para EPID-CTD con una sensibilidad y especificidad del 85,71% y 80%.

El área bajo la curva (AUC) es una medida comúnmente utilizada para establecer la precisión del corte. Las AUC pueden oscilar entre 0,5 y 1,0, donde 0,5 resulta de probabilidad aleatoria o no tiene capacidad predictiva, $\geq 0,75$ es bueno y $> 0,9$ es excelente. Cuanto mayor es el AUC, mejor es la capacidad diagnóstica de la prueba

(221). En este caso AGEs en este punto de corte y para esta serie, es un buen marcador para el diagnóstico de FPI y EPID-CTD.

AGEs se han estudiado como posibles biomarcadores sobre todo en diabetes mellitus, obesidad, aterosclerosis, fallo renal y alzheimer (222,223). En patología pulmonar se conoce el papel de AGE y su receptor en el desarrollo de la fibrosis, pero solo en algunos estudios se han medido los niveles de AGEs en EPID (122). También es conocida su relación con el desarrollo de conectivopatías (191,193,204) pero en estos casos solo se han valorado los niveles de AGEs en conectivopatías sin patología pulmonar.

Es por tanto la primera vez que se valora su sensibilidad y especificidad para diferenciar EPID, tanto FPI como EPID-CTD y por tanto se propone como un posible biomarcador en las EPID. En esta serie y con el valor de corte establecido en FPI y EPID-CTD ha dado niveles en AUC por encima del 75%.

AOPP se valora en sangre periférica, generalmente dentro de un conjunto de productos de oxidación junto con AGEs y productos de oxidación lipídica. En nuestro caso al evaluarla como marcador para EPID, solo se ha podido establecer como adecuado para la FPI. Con un nivel de corte de 202,461 μ M, el AUC fue 0,80 (95% CI= 0,63-0,98) y la sensibilidad y especificidad de 83,33% y 69,23%, respectivamente.

AOPP ha sido evaluado como marcador en pacientes diabéticos y otras enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo sin que hasta el momento se haya propuesto como un único biomarcador (223). Recientemente se propone como biomarcador en patología hepática(224) y alzheimer donde ,el análisis de las curvas ROC muestra un AUC de 0.730(225). Igualmente en una serie de fallo renal agudo muestra una alta sensibilidad y especificidad, proponiéndose como biomarcador en este caso (226). Aunque existen algunos datos que confirman un incremento de AOPP en pacientes con EPID (141) (227) no se ha analizado su papel como biomarcador en EPID .

MMP-7 y MMP-1 han sido las metaloproteasas más estudiadas en EPID (181) como marcadores de la remodelación de la matriz extracelular, pero también se conoce, como se ha descrito anteriormente, que los ROS son capaces de activar las MMPs y pueden jugar un papel significativo en la actividad no regulada de las MMPs en la fibrosis pulmonar(168).

Discusión

En nuestra serie MMP-7 es un magnifico marcador para diferenciar FPI y EPID-CTD de personas sanas. El punto de corte que se establece de 2,07 ng/mL permite obtener un AUC de 0,96 (95% CI = 0,91-1) para FPI y de 1 (95% CI = 1-1) para EPID-CTD.

Con ese punto de corte de la sensibilidad y especificidad para FPI 92,30% y 92,86%, respectivamente y para EPID-CTD, la sensibilidad alcanza el 100% y la especificidad el 92,85%. En nuestro caso MMP-7 no ha tenido capacidad de discriminar entre FPI y EPID-CTD, ni se ha podido demostrar su valor como marcador relacionado con ningún parámetro que la relacione con la clínica del paciente.

Existen datos en la literatura que si han puesto de manifestó el valor de MMP-7 como biomarcador pronóstico y diagnóstico y en algunos se combina MMP-7 con otros factores séricos pero hasta el momento no se ha considerado su uso clínico

En el estudio de Rosas y colaboradores se compararon los niveles sanguíneos de un panel de proteínas en pacientes con FPI (218). Documentaron un aumento en MMP7 y MMP1 y que los niveles de MMP7 se correlacionaron negativamente con el FVC% y la DLCO %.

En otros estudios realizados en pacientes con EPID se han propuesto a las MMP-7 y a las proteínas del surfatantes A (SP-A) como predictores significativos de la supervivencia junto con la edad, FVC y anomalías en la TACAR (227).

En 2015 Morais (219) ha presentado a MMP-7 como un posible biomarcador diagnóstico. Hasta ahora no se ha determinado que MMP-7 sea un buen marcador pronóstico en los casos de EPID-CTD (228). Aunque en dos cohortes de AR con EPID el AUC en las dos cohortes para MMP-7 se estableció en 0,90 para la enfermedad subclínica y 0,86 para la enfermedad establecida en una cohorte y en 0,81 y 0,83 en una segunda cohorte de enfermos. Cuando MMP-7 se combinó con otros marcadores como SP-D y citoquinas pulmonares pudo identificar la AR con afectación pulmonar con signos evidentes de enfermedad pulmonar y enfermedad subclínica (85).

Hasta ahora, los biomarcadores estudiados en EPID no han incluido moléculas relacionadas con el estrés oxidativo. Se han contemplado como biomarcadores las moléculas implicadas en la formación y remodelación de la matriz (MMP-1 y MMP-7), el metabolismo del epitelio alveolar y los procesos inmunológicos. Las más estudiadas

Discusión

como biomarcadores han sido SP-A y SP-D así como KL-6 (Krebs von den Lungen - 6), como molécula candidata para valorar la homeostasis alveolar epitelial (181).

El Grupo de Trabajo de Biomarcadores del NIH definió un biomarcador como "una característica que pueda ser objetivamente medida y evaluada como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica" (221). El proceso de validación de los biomarcadores se debe realizar en una población suficiente y en condiciones bien definidas. Los valores óptimos para un marcador deben validarse mediante ensayos clínicos sistemáticos, fiables, precisos y armonizados.

Se proponen como posible biomarcadores, por tanto, relacionados con estrés oxidativo en el manejo de las enfermedades intersticiales pulmonares difusas, en concreto en la FPI y en las EPID-CTD, AGEs y MMP-7 y AOPP solo en caso de FPI, siempre como marcadores que diferencian enfermos de sanos, ya que no se ha establecido ninguna relación con la clínica de los pacientes.

6. CONCLUSIONES

Conclusiones

Conclusiones

1. Todos los factores resultantes del estrés oxidativo, estudiados en los pacientes con enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID), se encuentran aumentados en sangre periférica al compararlos con los individuos sanos, con la excepción de los productos resultantes de la lipo-peroxidación: LOOH y TBARS.

2. De los factores resultantes del estrés oxidativo, los productos de glicación avanzados (AGEs) cuando se miden en sangre periférica diferencian pacientes afectados por EPID de los individuos sanos.

3. AGEs diferencian entre pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y los individuos sanos. Pero además distinguen entre FPI y aquellos con fibrosis pulmonar asociadas a enfermedades del colágeno (EPID-CTD). También discriminan entre estos últimos e individuos sanos

4. Los análisis de sensibilidad y especificidad y las curvas ROC permiten considerar a los AGEs como posible biomarcador para FPI y EPID-CTD, ya que la sensibilidad y especificidad para FPI fueron 71,43% y 80%, respectivamente y para EPI-CTD 85,71% y 80%, respectivamente. AGEs podría ser considerado como un biomarcador para diagnóstico diferencial de ambas patologías, sobre todo para los pacientes con EPID-CTD, cuando el cuadro pulmonar antecede a las manifestaciones de la conectivopatía.

5. Los productos de la oxidación avanzada de las proteínas (AOPP), también estaban incrementados en sangre periférica, identificando enfermos de EPID y sanos. AOPP diferencian pacientes con FPI y EPID-CTD de individuos sanos, cuando se consideran estos dos grupos de forma independiente. Es posible su uso como biomarcador solo en individuos con FPI, siendo su sensibilidad y especificidad de 83,33% y 69,23%, respectivamente.

6. Las defensas antioxidantes en sangre periférica eran más altas en los pacientes que en los controles para tioles totales, TAS y para la concentración másica de superóxido dismutasa extracelular (EC-SOD).

7. La actividad enzimática de EC-SOD no estaba elevada y el incremento en la concentración másica EC-SOD no puede explicarse por polimorfismos típicos de EC-SOD en FPI, ya que fueron negativos en nuestros pacientes.

Conclusiones

8. Solo la concentración másica de la EC-SOD identificó FPI y EPID-CTD de individuos sanos, mientras que en el caso de TAS y tioles totales, al considerar estos dos grupos por separado no distinguieron enfermos de controles.

9. El incremento de los tioles totales fue significativamente más alto en aquellos pacientes tratados con Acetilcisteína. Los pacientes sin este tratamiento no tenían los niveles de tioles totales aumentados.

10. A pesar de tener los enfermos de EPID un incremento de la actividad antioxidante, el balance oxidante/antioxidante (OX/AntiOX) es superior en los enfermos. Igualmente ocurrió al valorar de forma independiente a los pacientes con FPI y a los afectados con EPID-CTD.

11. Las concentraciones plasmáticas de la metaloproteinasa 7 (MMP-7) pusieron de manifiesto un incremento en enfermos, distinguiendo con una alta sensibilidad y especificidad entre los pacientes con FPI y EPID-CTD y los sujetos sanos, cuando se consideran los dos grupos de pacientes de forma independiente. La alta sensibilidad y especificidad para FPI (sensibilidad 92% y especificidad 92%) y para EPID-CTD (sensibilidad de 100% y especificidad de 92%) haría de MMP-7 un excelente biomarcador para EPID.

12 y Última. De los productos derivados del estrés oxidativo elevados en las EPID, AGEs podría considerarse un biomarcador para el diagnóstico diferencial entre FPI y EPID-CTD, algo relevante en estas patologías con solapamiento clínico. En el caso de AOPP solo se podría valorar su uso para el diagnóstico de FPI. MMP-7 sería un excelente biomarcador diagnóstico para FPI y EPID-CTD por su alta sensibilidad y especificidad en ambas patologías, sin que se pueda considerar su uso en el diagnóstico diferencial de ambas patologías, como ocurre con los AGEs.

7. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

Bibliografía

1. Deconinck B, Verschakelen J, Coolen J, Verbeken E, Verleden G, Wuyts W. Diagnostic workup for diffuse parenchymal lung disease: schematic flowchart, literature review, and pitfalls. *Lung*. 2013;191(1):19-25.
2. Antin-Ozerkis D. Interstitial Lung Disease: A Clinical Overview and General Approach. In: Grippi MA, Elias JA, Fishman JA, Kotloff RM, Pack AI, Senior RM et al., editores. *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders*. 5º ed. Nueva York: McGraw-Hill Education; 2015;p.9-25.
3. Ryu JH, Daniels CE, Hartman TE, Eunhee SY. Diagnosis of interstitial lung diseases. *Mayo Clin Proc*. 2007 Aug;82(8):976-986.
4. Du Bois RM, Richeldi L. Introduction. In: Du Bois RM, Richeldi L.,editors. *European Respiratory Monograph 46: Interstitial Lung Diseases*. 1º ed. Plymouth: European Respiratory Society; 2009;9-10.
5. Dempsey Owen J, Paterson Edward W, Kerr Keith M, Denison Alan R. Sarcoidosis. *BMJ*. 2009;339:3206.
6. Iannuzzi MC, Rybicki BA. Genetics of sarcoidosis: candidate genes and genome scans. *Proc Am Thorac Soc*. 2007 Jan;4(1):108-16.
7. Saketkoo LA, Mittoo S, Huscher D, Khanna D, Dellaripa PF, Distler O, et al. Connective tissue disease related interstitial lung diseases and idiopathic pulmonary fibrosis: provisional core sets of domains and instruments for use in clinical trials. *Thorax*. 2014 May;69(5):428-436.
8. Woodhead F, Wells AU, Desai SR. Pulmonary complications of connective tissue diseases. *Clin Chest Med*. 2008 Mar;29(1):149-164.
9. López-Campos JL, Rodríguez-Becerra E. Registry of Interstitial Lung Diseases. Incidence of interstitial lung diseases in the south of Spain 1998-2000: the RENIA study. *Eur J Epidemiol*. 2004;19(2):155–161.
10. Jareño-Estaban JJ, De Granda-Orive I, Arias-Arias. Enfermedades pulmonares intersticiales. Conceptos generales y clasificación. In: Bermúdez JA, de Miguel Díez J.,editors. *Enfermedades pulmonares intersticiales difusas*. 1º ed. Madrid: Ergon; 2008;9-25.
11. Thomeer M, Demedts M, Vandeurzen K. Registration of interstitial lung diseases by 20 centres of respiratory medicine in Flanders. *Acta Clin Belg*. 2001;56(3):163-172.
12. Gibson GJ, Loddenkemper R, Lundback B, Sibille Y. Respiratory health and disease in Europe: the new European Lung White Book. *Eur Respir J*. 2013;42(3):559-563.
13. Sgalla G, Biffi A, Richeldi L. Idiopathic pulmonary fibrosis: Diagnosis, epidemiology and natural history. *Respirology*. 2016;21(3):427–437.
14. Raghu G, Rochwerg B, Zhang Y, Garcia CAC, Azuma A, Behr J, et al. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192(2):3–19.
15. A Travis WD, King TE, Bateman ED, Lynch DA, Capron F, Center D, et al.

Bibliografía

- American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165(2):277-304.
16. Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King Jr TE, Lynch DA, Nicholson AG, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188(6):733-748.
 17. Dempsey OJ, Kerr KM, Remmen H, Denison AR. How to investigate a patient with suspected interstitial lung disease. *BMJ.* 2010;340:2843.
 18. Kocheril SV, Appleton BE, Somers EC, Kazerooni EA, Flaherty KR, Martinez FJ, et al. Comparison of disease progression and mortality of connective tissue disease-related interstitial lung disease and idiopathic interstitial pneumonia. *Arthritis Rheum.* 2005;53(4):549-57.
 19. Ryerson CJ, Collard HR. Update on the diagnosis and classification of ILD. *Curr Opin Pulm Med.* 2013 Sep;19(5):453-9..
 20. Mahler DA, Wells CK. Evaluation of Clinical Methods for Rating Dyspnea. *Chest.* 2006;93(3):580-586.
 21. Brown KK. Chronic cough due to chronic interstitial pulmonary diseases: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest.* 2006;129(1):180-185.
 22. Mendez JL, Nadrous HF, Vassallo R, Decker PA, Ryu JH. Pneumothorax in Pulmonary Langerhans Cell Histiocytosis. *Chest.* 2004;125:1028-1032.
 23. Lara AR, Schwarz MI. Diffuse alveolar hemorrhage. *Chest.* 2010;137(5):1164-1171.
 24. Olson AL, Swigris JJ, Lezotte DC, Norris JM, Wilson CG, Brown KK. Mortality from Pulmonary Fibrosis Increased in the United States from 1992 to 2003. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176(3):277-284.
 25. Flaherty KR, King TE Jr., Raghu G, Lynch JP III, Colby TV, Travis WD, et al. Idiopathic Interstitial Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170(8):904-910.
 26. King TE, Tooze JA, Schwarz MI, Brown KR, Cherniack RM. Predicting survival in idiopathic pulmonary fibrosis: scoring system and survival model. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(7):1171-1181.
 27. Xaubet A, Ancochea J, Blanquer R, Montero C, Morell F, Becerra ER, et al. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas. *Arch Bronconeumol.* 2003;39(12):580-600.
 28. Wells AU, Hirani N. Interstitial lung disease guideline. *Thorax.* 2008;63(5):1-58.
 29. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, et al. 2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum.* 2012;65(1):1-11.
 30. Foulon G, Delaval P, Valeyre D, Wallaert B, Debray M-P, Brauner M, et al.

Bibliografía

- ANCA-associated lung fibrosis: Analysis of 17 patients. *Respir Med*. 2008;102(10):1392–1398.
31. Yamada H. ANCA-Associated Lung Fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2011;32(03):322–327.
 32. Nozu T, Kondo M, Suzuki K, Tamaoki J, Nagai A. A comparison of the clinical features of ANCA-positive and ANCA-negative idiopathic pulmonary fibrosis patients. *Respiration*. 2009;77(4):407–415.
 33. Lynch DA. Lung disease related to collagen vascular disease. *J Thorac Imaging*. 2009;24(4):299–309.
 34. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum*. 2000;43(1):155–163.
 35. Zhu J, Zhou Y, Chen X, Li J. A metaanalysis of the increased risk of rheumatoid arthritis-related pulmonary disease as a result of serum anticitrullinated protein antibody positivity. *J Rheumatol*. 2014;41(7):1282–1289.
 36. Arroyo-Ávila M, Santiago-Casas Y, McGwin G, Cantor RS, Petri M, Ramsey-Goldman R, et al. Clinical associations of anti-Smith antibodies in PROFILE: a multi-ethnic lupus cohort. *Clin Rheumatol*. 2015;34(7):1217–1223.
 37. Schmidt WA, Wetzel W, Friedländer R, Lange R, Sörensen HF, Lichey HJ, et al. Clinical and serological aspects of patients with anti-Jo-1 antibodies—an evolving spectrum of disease manifestations. *Clin Rheumatol*. 2000;19(5):371–7.
 38. Richards TJ, Eggebeen A, Gibson K, Yousem S, Fuhrman C, Gochuico BR, et al. Characterization and peripheral blood biomarker assessment of anti-Jo-1 antibody-positive interstitial lung disease. *Arthritis Rheum*. 2009;60(7):2183–2192.
 39. Chatterjee SO, Prayson R, Farver CA. Antisynthetase syndrome: not just an inflammatory myopathy. *Cleve Clin J Med*. 2013;80(10):655–666.
 40. Hervier B, Devilliers H, Stanciu R, Meyer A, Uzunhan Y, Masseau A, et al. Hierarchical cluster and survival analyses of antisynthetase syndrome: Phenotype and outcome are correlated with anti-tRNA synthetase antibody specificity. *Autoimmun Rev*. 2012;12(2):210–217.
 41. Uhal BD, Li X, Piasecki CC, Molina-Molina M. Angiotensin signalling in pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(3):465–468.
 42. Sanghavi SK, Abu-Elmagd K, Keightley MC, St George K, Lewandowski K, Boes SS, et al. Relationship of cytomegalovirus load assessed by real-time PCR to pp65 antigenemia in organ transplant recipients. *J Clin Virol*. 2008;42(4):335–342.
 43. De Paschale M, Agrappi C, Manco MT, Mirri P, Viganò EF, Clerici P. Seroepidemiology of EBV and interpretation of the “isolated VCA IgG” pattern. *J Med Virol*. 2009;81(2):325–331.

Bibliografía

44. Fernández OA. Marcadores séricos en la fibrosis pulmonar idiopática. Implicación pronóstica. Arch Bronconeumol. 2006;42(8):377–379.
45. Palleiro AG, Franquet T. Patrones radiológicos en la enfermedad pulmonar intersticial. Semin Fund Esp Reumatol. 2013;14(4):97–105.
46. Gotway MB, Freemer MM, King TE. Challenges in pulmonary fibrosis. 1: Use of high resolution CT scanning of the lung for the evaluation of patients with idiopathic interstitial pneumonias. Thorax. 2007;62(6):546–553.
47. Raghu G, Lynch D, Godwin JD, Webb R, Colby TV, Leslie KO, et al. Diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis with high-resolution CT in patients with little or no radiological evidence of honeycombing: secondary analysis of a randomised, controlled trial. Lancet Respir Med. 2014;2(4):277–284.
48. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-based Guidelines for Diagnosis and Management. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183(6):788–824.
49. Latsi PI, Bois du RM, Nicholson AG, Colby TV, Bisirtzoglou D, Nikolakopoulou A, et al. Fibrotic Idiopathic Interstitial Pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 2003;168(5):531–537.
50. Bradley B, Branley HM, Egan JJ, Greaves MS, Hansell DM, Harrison NK, et al. Interstitial lung disease guideline: the British Thoracic Society in collaboration with the Thoracic Society of Australia and New Zealand and the Irish Thoracic Society. Thorax. 2008;63:1-58.
51. Cortes-Telles A, Forkert L, O'Donnell DE, Moran-Mendoza O. Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights on functional characteristics at diagnosis. Can Respir J. 2014;21(3):55–60.
52. Casan Clarà P, Martínez González C, Ancochea J. Lung function testing in idiopathic pulmonary fibrosis: More than just spirometry? Arch Bronconeumol. 2016;52(9):457–458.
53. Bois RMD, Weycker D, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Kartashov A, et al. Six-Minute-Walk Test in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183(9):1231–1237.
54. Mura M, Porretta MA, Bargagli E, Sergiacomi G, Zompatori M, Sverzellati N, et al. Predicting survival in newly diagnosed idiopathic pulmonary fibrosis: a 3-year prospective study. Eur Respir J. 2012;40(1):101–109.
55. Flaherty KR, Andrei A-C, Murray S, Fraley C, Colby TV, Travis WD, et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2006;174(7):803–809.
56. Hesselstrand R, Wildt M, Bozovic G, Andersson-Sjöland A, Andréasson K, Scheja A, et al. Biomarkers from bronchoalveolar lavage fluid in systemic sclerosis patients with interstitial lung disease relate to severity of lung fibrosis. Respir Med. 2013;107(7):1079–86.
57. Hernández-González F, Lucena CM, Ramírez J, Sánchez M, Jimenez MJ, Xaubet A, et al. Cryobiopsy in the diagnosis of diffuse interstitial lung disease:

Bibliografía

- yield and cost-effectiveness analysis. Arch Bronconeumol. 2015;51(6):261–267.
58. Fibla JJ, Molins L, Blanco A, Royo Í, Vallina PM, Martínez N, et al. Biopsia pulmonar por videotoracosopia en el diagnóstico de la enfermedad pulmonar intersticial. Estudio prospectivo y multicéntrico en 224 pacientes. Arch Bronconeumol. 2012;48(3):81–85.
 59. Spagnolo P, Del Giovane C, Luppi F, Cerri S, Balduzzi S, Walters EH, et al. Non-steroid agents for idiopathic pulmonary fibrosis. The Cochrane Library. 2010.
 60. Raghu G, Anstrom KJ, King TE Jr, Lasky JA, Martinez FJ. Prednisone, Azathioprine, andn-acetylcysteine for Pulmonary Fibrosis. N Engl J Med. 2012;367(9):870-871.
 61. Demedts M, Behr J, Buhl R, Costabel U, Dekhuijzen R, Jansen HM, et al. High-dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. N Engl J Med. 2005;353(21):2229–2242.
 62. Iyer SN, Gurujeyalakshmi G, Giri SN. Effects of pirfenidone on procollagen gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis. J Pharmacol Exp Ther. 1999;289(1):211–218.
 63. Schaefer CJ, Ruhmundt DW, Pan L, Seiwert SD, Kossen K. Antifibrotic activities of pirfenidone in animal models. Eur Respir Rev. 2011;20(120):85–97.
 64. King TE, Bradford WZ, Castro-Bernardini S, Fagan EA, Glaspole I, Glassberg MK, et al. A Phase 3 Trial of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. N Engl J Med. 2014;370(22):2083–2092.
 65. Azuma A, Nukiwa T, Tsuboi E, Suga M, Abe S, Nakata K, et al. Double-blind, Placebo-controlled Trial of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2005;171(9):1040–1047.
 66. Noble PW, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Glassberg MK, Kardatzke D, et al. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. Lancet Respir Med. 2011;377(9779):1760-1769.
 67. Wollin L, Maillet I, Quesniaux V, Holweg A, Ryffel B. Antifibrotic and Anti-inflammatory Activity of the Tyrosine Kinase Inhibitor Nintedanib in Experimental Models of Lung Fibrosis. J Pharmacol Exp Ther. 2014;349(2):209–220.
 68. Richeldi L, Cottin V, Flaherty KR, Kolb M, Inoue Y, Raghu G, et al. Two phase 3 trials of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Respir Med. 2014;108(7):1023–1030.
 69. Lee JS, Ryu JH, Elicker BM, Lydell CP, Jones KD, Wolters PJ, et al. Gastroesophageal Reflux Therapy Is Associated with Longer Survival in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2011;184(12):1390–1394.
 70. Lee JS, Collard HR, Anstrom KJ, Martinez FJ, Noth I, Roberts RS et al. Anti-acid treatment and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis: an

Bibliografía

- analysis of data from three randomised controlled trials. *Lancet Respir Med*. 2013;1(5):369-376.
71. Jackson RM, Glassberg MK, Ramos CF, Bejarano PA, Butrous G, Gómez-Marín O. Sildenafil therapy and exercise tolerance in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lung*. 2010;188(2):115–123.
 72. Zisman DA, Schwarz M, Anstrom KJ, Collard HR, Flaherty KR, Hunninghake GW. A controlled trial of sildenafil in advanced idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2010;363(7):620–628.
 73. King TE Jr., Behr J, Brown KK, Bois du RM, Lancaster L, de Andrade JA, et al. BUILD-1: A Randomized Placebo-controlled Trial of Bosentan in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(1):75–81.
 74. King TE Jr., Brown KK, Raghu G, Bois du RM, Lynch DA, Martinez F, et al. BUILD-3: A Randomized, Controlled Trial of Bosentan in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(1):92–99.
 75. Raghu G, Million-Rousseau R, Morganti A, Perchenet L, Behr J. Macitentan for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: the randomised controlled MUSIC trial. *Eur Respir J*. 2013;42(6):1622-1632.
 76. Crockett A, Cranston JM, Antic N. Domiciliary oxygen for interstitial lung disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2001;(3).
 77. Nishiyama O, Kondoh Y, Kimura T, Kato K, Kataoka K, Ogawa T, et al. Effects of pulmonary rehabilitation in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology*. 2008;13(3):394-399.
 78. George TJ, Arnaoutakis GJ, Shah AS. Lung Transplant in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Arch Surg*. 2011;146(10):1204–1209.
 79. Horton MR, Santopietro V, Mathew L, Horton KM, Polito AJ, Liu MC, et al. Thalidomide for the treatment of cough in idiopathic pulmonary fibrosis: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2012;157(6):398–406.
 80. Bois du RM, Weycker D, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Kartashov A, et al. Ascertainment of Individual Risk of Mortality for Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(4):459–466.
 81. Ley B, Ryerson CJ, Vittinghoff E, Ryu JH, Tomassetti S, Lee JS, et al. A multidimensional index and staging system for idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Intern Med*. 2012;156(10):684–691.
 82. Nadrous HF, Pellikka PA, Krowka MJ, Swanson KL, Chaowalit N, Decker PA, et al. Pulmonary hypertension in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2005;128(4):2393–2399.
 83. Katz PO, Gerson LB, Vela MF. Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol*. 2013;108(3):308–328.
 84. Flaherty KR, Toews GB, Travis WD, Colby TV, Kazerooni EA, Gross BH, et al. Clinical significance of histological classification of idiopathic interstitial pneumonia. *Eur Respir J*. 2002 Feb;19(2):275-83.

Bibliografía

85. Doyle TJ, Patel AS, Hatabu H, Nishino M, Wu G, Osorio JC, et al. Detection of Rheumatoid Arthritis–Interstitial Lung Disease Is Enhanced by Serum Biomarkers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;191(12):1403–1412.
86. Tanaka N, Kim JS, Newell JD, Brown KK, Cool CD, Meehan R, et al. Rheumatoid Arthritis–related Lung Diseases: CT Findings. *Radiology*. 2004;232(1):81–91.
87. Fischer A, West SG, Swigris JJ, Brown KK, Bois du RM. Connective Tissue Disease–Associated Interstitial Lung Disease. *Chest*. 2010;138(2):251–256.
88. Kinder BW, Collard HR, Koth L, Daikh DI, Wolters PJ, Elicker B, et al. Idiopathic Nonspecific Interstitial Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(7):691–697.
89. Vij R, Noth I, Strek ME. Autoimmune–Featured Interstitial Lung Disease. *Chest*. 2011;140(5):1292–1299.
90. Flaherty KR, Colby TV, Travis WD, Toews GB, Mumford J, Murray S, et al. Fibroblastic Foci in Usual Interstitial Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(10):1410–1415.
91. Navaratnam V, Ali N, Smith CJP, McKeever T, Fogarty A, Hubbard RB. Does the presence of connective tissue disease modify survival in patients with pulmonary fibrosis?. *Respir Med*. 2011;105(12):1925–1930.
92. Kim EJ, Elicker BM, Maldonado F, Webb WR, Ryu JH, Van Uden JH, et al. Usual interstitial pneumonia in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Eur Respir J*. 2010;35(6):1322–1328.
93. Tiev KP, Cabane J, Aubourg F, Kettaneh A, Ziani M, Mouthon L, et al. Severity of scleroderma lung disease is related to alveolar concentration of nitric oxide. *Eur Respir J*. 2007;30(1):26–30.
94. Buzan MTA, Pop CM. State of the art in the diagnosis and management of interstitial lung disease. *Clujul Medical*. 2015;88(2):116–118.
95. Wuyts WA, Agostini C, Antoniou KM, Bouros D, Chambers RC, Cottin V, et al. The pathogenesis of pulmonary fibrosis: a moving target. *Eur Respir J*. 2013;41(5):1207–1218.
96. Ahluwalia N, Shea BS, Tager AM. New Therapeutic Targets in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Aiming to Rein in Runaway Wound-Healing Responses. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190(8):867–878.
97. Wolters PJ, Collard HR, Jones KD. Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2014;9(1):157–179.
98. Todd NW, Luzina IG, Atamas SP. Molecular and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5(1):11.
99. Duracková Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res*. 2010;59(4):459–69.
100. Thannickal VJ, Toews GB, White ES, Lynch Iii JP, Martinez FJ. Mechanisms of pulmonary fibrosis. *Annu. Rev. Med*. 2004;55:395–417.

Bibliografía

101. Kurundkar A, Thannickal VJ. Redox mechanisms in age-related lung fibrosis. *Redox Biology*. 2016;9:67–76.
102. Rahman I, Skwarska E, Henry M, Davis M, O'Connor CM, FitzGerald MX, et al. Systemic and pulmonary oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(1-2):60–8.
103. Montuschi P, Corradi M, Ciabattini G, Nightingale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(1):216–220.
104. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Valle NR-D, Huang P. Redox Regulation of Cell Survival. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(8):1343–1374.
105. Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide Dismutases in the Lung and Human Lung Diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(12):1600–1619.
106. Selman M, Pardo A. Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3(4):364–372.
107. Khalil N, O'Connor RN, Flanders KC, Unruh H. TGF-beta 1, but not TGF-beta 2 or TGF-beta 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996;14(2):131–138.
108. Rock JR, Barkauskas CE, Counce MJ, Xue Y, Harris JR, Liang J, et al. Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(52):1475–1483.
109. King TE, Schwarz MI, Brown K, Tooze JA, Colby TV, Waldron JA, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(6):1025–1032.
110. Hecker L, Vittal R, Jones T, Jagirdar R, Luckhardt TR, Horowitz JC, et al. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nat Med*. 2009;15(9):1077–1081.
111. Cho H-Y, Reddy SP, Kleeberger SR. Nrf2 defends the lung from oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(1-2):76–87.
112. Kikuchi N, Ishii Y, Morishima Y, Yageta Y, Haraguchi N, Itoh K, et al. Nrf2 protects against pulmonary fibrosis by regulating the lung oxidant level and Th1/Th2 balance. *Respir Res*. 2010;11(1):646–712.
113. Negre-Salvayre A, Auge N, Ayala V, Basaga H, Boada J, Brenke R, et al. Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radic Res*. 2010;44(10):1125–1171.
114. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2014;18(1):1-4.
115. Jaisson S, Gillery P. Evaluation of nonenzymatic posttranslational modification-derived products as biomarkers of molecular aging of proteins. *Clin Chem*.

2010;56(9):1401–1412.

116. Hashimoto K, Kunikata H, Yasuda M, Ito A, Aizawa N, Sawada S, et al. The relationship between advanced glycation end products and ocular circulation in type 2 diabetes. *J Diabetes Complications*. 2016;30(7):1371–7.
117. Smit AJ, Lutgers HL. The clinical relevance of advanced glycation endproducts (AGE) and recent developments in pharmaceuticals to reduce AGE accumulation. *Curr Med Chem*. 2004;11(20):2767–2784.
118. Stitt AW. Advanced glycation: an important pathological event in diabetic and age related ocular disease. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(6):746–753.
119. Tan KCB, Chow W-S, Lam JCM, Lam B, Bucala R, Betteridge J, et al. Advanced glycation endproducts in nondiabetic patients with obstructive sleep apnea. *Sleep*. 2006;29(3):329–333.
120. Smit PJ, Guo WA, Davidson BA, Mullan BA, Helinski JD, Knight PR. Dietary advanced glycation end-products, its pulmonary receptor, and high mobility group box 1 in aspiration lung injury. *J Surg Res*. 2014;191(1):214–223.
121. Matsuse T, Ohga E, Teramoto S, Fukayama M, Nagai R, Horiuchi S, et al. Immunohistochemical localisation of advanced glycation end products in pulmonary fibrosis. *J Clin Pathol*. 1998;51(7):515–519.
122. Kyung SY, Byun KH, Yoon JY, Kim YJ, Lee SP, Park J-W, et al. Advanced glycation end-products and receptor for advanced glycation end-products expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and NSIP. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(1):221–228.
123. Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes. *J Clin Invest*. 1994;94(1):110–117.
124. Chen L, Wang T, Wang X, Sun B-B, Li J-Q, Liu D-S, et al. Blockade of advanced glycation end product formation attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Respir Res*. 2009;10(1):122–128.
125. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med*. 2005;83(11):876–886.
126. Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. Arguing for the motion: yes, RAGE is a receptor for advanced glycation endproducts. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51(9):1111–1115.
127. Mukherjee TK, Mukhopadhyay S, Hoidal JR. Implication of receptor for advanced glycation end product (RAGE) in pulmonary health and pathophysiology. *Respir Physiol Neurobiol*. 2008;162(3):210–215.
128. Demling N, Ehrhardt C, Kasper M, Laue M, Knels L, Rieber EP. Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells. *Cell Tissue Res*. 2006;323(3):475–488.
129. Vetter SW. Glycated Serum Albumin and AGE Receptors. *Adv Clin Chem*.

2015;72:205-275.

130. Hou J, Zheng D, Fung G, Deng H, Chen L, Liang J, et al. Mangiferin suppressed advanced glycation end products (AGEs) through NF- κ B deactivation and displayed anti-inflammatory effects in streptozotocin and high fat diet-diabetic cardiomyopathy rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2016;94(3):332–340.
131. Uchida T, Shirasawa M, Ware LB, Kojima K, Hata Y, Makita K, et al. Receptor for Advanced Glycation End-Products Is a Marker of Type I Cell Injury in Acute Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(9):1008–1015.
132. Yonchuk JG, Silverman EK, Bowler RP, Agustí A, Lomas DA, Miller BE, et al. Circulating soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) as a biomarker of emphysema and the RAGE axis in the lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192(7):785–792.
133. Chow C-W, Herrera Abreu MT, Suzuki T, Downey GP. Oxidative Stress and Acute Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;29(4):427–431.
134. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*. 1996;49(5):1304–1313.
135. Ye W, Zhong Z, Zhu S, Zheng S, Xiao J, Song S, et al. Advanced oxidation protein products induce catabolic effect through oxidant-dependent activation of NF- κ B pathway in human chondrocyte. *Int Immunopharmacol*. 2016 ;39:149–157.
136. Zhou LL, Cao W, Xie C, Tian J, Zhou Z, Zhou Q, et al. The receptor of advanced glycation end products plays a central role in advanced oxidation protein products-induced podocyte apoptosis. *Kidney Int*. 2012 Oct;82(7):759–770.
137. Cao W, Hou FF, Nie J. AOPPs and the progression of kidney disease. *Kidney Int*. 2014;4(1):102–106.
138. Cristani M, Speciale A, Saija A, Gangemi S, Lucia Minciullo P, Cimino F. Circulating advanced oxidation protein products as oxidative stress biomarkers and progression mediators in pathological conditions related to inflammation and immune dysregulation. *Curr Med Chem*. 2016;23(34):3862-3882.
139. Du S, Ai J, Zeng X, Wan J, Wu X, He J. Plasma level of advanced oxidation protein products as a novel biomarker of acute lung injury following cardiac surgery. *Springerplus*. 2016;5:231.
140. Korkmaz GG, Inal BB, Ortakoylu GM, Irmak H, Kara AA, Gelisgen R, et al. Changes in oxidative stress parameters and antioxidant status in lung cancer: Western blot analysis of nitrotyrosine and protein carbonyls content. *Clin Lab*. 2014;60(4):599–607.
141. Servettaz A, Goulvestre C, Kaviani N, Nicco C, Guilpain P, Chéreau C, et al. Selective oxidation of DNA topoisomerase 1 induces systemic sclerosis in the mouse. *J Immunol*. 2009;182(9):5855–5864.
142. Busch CJ, Binder CJ. Malondialdehyde epitopes as mediators of sterile

Bibliografía

inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. Biochim Biophys Acta. 2016.

143. Niki E. Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. *Biofactors*. 2008;34(2):171-180.
144. Kurutas EB. Evaluation of method performance for oxidative stress biomarkers in urine and biological variations in urine of patients with type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Biol Proced Online*. 2015;17(1):3.
145. Miyamoto S, Di Mascio P. Lipid hydroperoxides as a source of singlet molecular oxygen. *Subcell Biochem*. 2014;77:3-20.
146. McCord JM. Evolution of free radicals and oxidative stress. *AM J Med*. 2000;108(8):652-659.
147. Siwek M, Sowa-Kucma M, Styczen K, Misztak P, Szewczyk B, Topor-Madry R, et al. Thiobarbituric Acid-Reactive Substances: Markers of an Acute Episode and a Late Stage of Bipolar Disorder. *Neuropsychobiology*. 2016;73(2):116–22.
148. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem*. 2016;2697(16):30357-30358.
149. Biswas S, Chida AS, Rahman I. Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. *Biochem Pharmacol*. 2006;71(5):551–564.
150. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2010;48(6):749–762.
151. Ramirez A, Ramadan B, Ritzenthaler JD, Rivera HN, Jones DP, Roman J. Extracellular cysteine/cystine redox potential controls lung fibroblast proliferation and matrix expression through upregulation of transforming growth factor-beta. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293(4):972-981.
152. Avissar N, Finkelstein JN, Horowitz S, Willey JC, Coy E, Frampton MW, et al. Extracellular glutathione peroxidase in human lung epithelial lining fluid and in lung cells. *Am J Physiol*. 1996;270(2):173–182.
153. Iyer SS, Ramirez AM, Ritzenthaler JD, Torres-Gonzalez E, Roser-Page S, Mora AL, et al. Oxidation of extracellular cysteine/cystine redox state in bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009;296(1):37-45.
154. Beeh KM, Beier J, Haas IC, Kornmann O, Micke P, Buhl R. Glutathione deficiency of the lower respiratory tract in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2002;19(6):1119–1123.
155. Rahman T, Hosen I, Islam MMT, Shekhar HU. Oxidative stress and human health. *ABB*. 2012;03(07):997–1019.
156. Ookawara T, Imazeki N, Matsubara O, Kizaki T, Oh-Ishi S, Nakao C, et al. Tissue distribution of immunoreactive mouse extracellular superoxide dismutase. *Am J Physiol*. 1998;275(3):840–847.

Bibliografía

157. Folz RJ, Guan J, Seldin MF, Oury TD, Enghild JJ, Crapo JD. Mouse extracellular superoxide dismutase: primary structure, tissue-specific gene expression, chromosomal localization, and lung in situ hybridization. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997;17(4):393–403.
158. Gao F, Kinnula VL, Myllärniemi M, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(2):343–354.
159. Kliment CR, Oury TD. Oxidative stress, extracellular matrix targets, and idiopathic pulmonary fibrosis. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(5):707–717.
160. Petersen SV, Oury TD, Ostergaard L, Valnickova Z, Wegrzyn J, Thogersen IB, et al. Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) binds to type I collagen and protects against oxidative fragmentation. *J Biol Chem*. 2004;279(14):13705–13710.
161. Fattman CL, Chang L-Y, Termin TA, Petersen L, Enghild JJ, Oury TD. Enhanced bleomycin-induced pulmonary damage in mice lacking extracellular superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med*. 2003;35(7):763–771.
162. Fattman CL, Chu CT, Kulich SM, Enghild JJ, Oury TD. Altered expression of extracellular superoxide dismutase in mouse lung after bleomycin treatment. *Free Radic Biol Med*. 2001;31(10):1198–1207.
163. Tan RJ. Redistribution of pulmonary EC-SOD after exposure to asbestos. *J Appl Physiol*. 2004;97(5):2006–2013.
164. Palabiyik SS, Girgin G, Tutkun E, Yilmaz OH, Baydar T. Immunomodulation and oxidative stress in denim sandblasting workers: changes caused by silica exposure. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2013;64(3):431–437.
165. Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini Z, Ben-Dor A, et al. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(9):6292–6297.
166. Oikonomidi S, Kostikas K, Tsilioni I, Tanou K, Gourgoulialis KI, Kiropoulos TS. Matrix metalloproteinases in respiratory diseases: from pathogenesis to potential clinical implications. *Curr Med Chem*. 2009;16(10):1214–1228.
167. Kinnula VL, Fattman CL, Tan RJ, Oury TD. Oxidative stress in pulmonary fibrosis: a possible role for redox modulatory therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(4):417–422.
168. Nelson KK, Melendez JA. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(6):768–784.
169. Vuorinen K, Myllärniemi M, Lammi L, Piirilä P, Ryttilä P, Salmenkivi K, et al. Elevated matrilysin levels in bronchoalveolar lavage fluid do not distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from other interstitial lung diseases. *APMIS*. 2007;115(8):969–975.
170. Huh JW, Kim DS, Oh Y-M, Shim TS, Lim CM, Lee SD, et al. Is Metalloproteinase-7 Specific for Idiopathic Pulmonary Fibrosis? *Chest*. 2008;133(5):1101–1106.
171. Henle T, Deppisch R, Beck W, Hergesell O, Hänsch GM, Ritz E. Advanced

Bibliografía

- glycated end-products (AGE) during haemodialysis treatment: discrepant results with different methodologies reflecting the heterogeneity of AGE compounds. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14(8):1968–1675.
172. Garcia-Fernandez MI, Gheduzzi D, Boraldi F, Paolinelli CD, Sanchez P, Valdivielso P, et al. Parameters of oxidative stress are present in the circulation of PXE patients. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1782(7-8):474–481.
173. Arab K, Steghens J-P. Plasma lipid hydroperoxides measurement by an automated xylene orange method. *Anal Biochem*. 2004;325(1):158–163.
174. Halliwell B, Hu ML, Louie S, Duvall TR, Tarkington BK, Motchnik P, et al. Interaction of nitrogen dioxide with human plasma. Antioxidant depletion and oxidative damage. *FEBS Lett*. 1992;313(1):62–66.
175. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*. 1993;84(4):407–412.
176. Paoletti F, Mocali A. Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H Oxidation. *Methods Enzymol*. 1990;186:209-220.
177. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:646-664.
178. de Lauretis A, Veeraraghavan S, Renzoni EA. Connective tissue disease-associated interstitial lung disease: How does it differ from IPF? How should the clinical approach differ? *Chron Respir Dis*. 2011;8(1):53-82.
179. De Lauretis A, Renzoni EA. Molecular biomarkers in interstitial lung diseases. *Mol Diagn Ther*. 2014;18(5):505–522.
180. White ES, Xia M, Murray S, Dyal R, Flaherty CM, Flaherty KR, et al. Plasma Surfactant Protein-D, Matrix Metalloproteinase-7, and Osteopontin Index Distinguishes Idiopathic Pulmonary Fibrosis from Other Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;194(10):1242–1251.
181. Nathan N, Corvol H, Amselem S, Clement A. Biomarkers in Interstitial lung diseases. *Paediatr Respir Rev*. 2015;16(4):219–224.
182. Hamai K, Iwamoto H, Ishikawa N, Horimasu Y, Masuda T, Miyamoto S, et al. Comparative Study of Circulating MMP-7, CCL18, KL-6, SP-A, and SP-D as Disease Markers of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Dis Markers*. 2016; 2016: 4759040.
183. De Lauretis A, Renzoni EA. Molecular biomarkers in interstitial lung diseases. *Mol Diagn Ther*. 2014;18(5):505–522.
184. Blackwell TS, Tager AM, Borok Z, Moore BB, Schwartz DA, Anstrom KJ, et al. Future Directions in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Research. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(2):214–222.
185. Herazo-Maya JD, Noth I, Duncan SR, Kim S, Ma S-F, Tseng GC, et al.

Bibliografía

- Peripheral blood mononuclear cell gene expression profiles predict poor outcome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sci Transl Med*. 2013;5(205):205.
186. Cheres P, Kim S-J, Tulasiram S, Kamp DW. Oxidative stress and pulmonary fibrosis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(7):1028–1040.
 187. Kinnula VL, Myllärniemi M. Oxidant-antioxidant imbalance as a potential contributor to the progression of human pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(4):727–738.
 188. Mink SN, Maycher B. Comparative manifestations and diagnostic accuracy of high-resolution computed tomography in usual interstitial pneumonia and nonspecific interstitial pneumonia. *Curr Opin Pulm Med*. 2012;18(5):530-534.
 189. Mathai SC, Danoff SK. Management of interstitial lung disease associated with connective tissue disease. *Curr Opin Rheumatol*. 2016;28(3):236-245..
 190. Machahua C, Montes-Worboys A, Llatjos R, Escobar I, Dorca J, Molina-Molina M, et al. Increased AGE-RAGE ratio in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 2016;17(1):144.
 191. Gautieri A, Passini FS, Silván U, Guizar-Sicairos M, Carimati G, Volpi P, et al. Advanced glycation end-products: Mechanics of aged collagen from molecule to tissue. *Matrix Biol*. 2016;9(2):22-27.
 192. Fessel G, Li Y, Diederich V, Guizar-Sicairos M, Schneider P, Sell DR, et al. Advanced glycation end-products reduce collagen molecular sliding to affect collagen fibril damage mechanisms but not stiffness. *PloS one*. 2014;9(11):143-150.
 193. Kurien BT, Scofield RH. Autoimmunity and oxidatively modified autoantigens. *Autoimmun Rev*. 2008;7(7):567–573.
 194. de Groot L, Jager NA, Westra J, Smit AJ, Kallenberg CGM, Posthumus MD, et al. Does reduction of disease activity improve early markers of cardiovascular disease in newly diagnosed rheumatoid arthritis patients? *Rheumatology*. 2015;54(7):1257–1261.
 195. Miyata T, Ishiguro N, Yasuda Y, Ito T, Nangaku M, Iwata H, et al. Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and its relation with inflammatory markers. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;244(1):45–49.
 196. Rodríguez-García J, Requena JR, Rodríguez-Segade S. Increased concentrations of serum pentosidine in rheumatoid arthritis. *Clinical Chemistry*. 1998;44(2):250–255.
 197. Drinda S, Franke S, Rüster M, Petrow P, Pullig O, Stein G, et al. Identification of the receptor for advanced glycation end products in synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2005 ;25(6):411–413.
 198. Sunahori K, Yamamura M, Yamana J, Takasugi K, Kawashima M, Makino H. Increased expression of receptor for advanced glycation end products by synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54(1):97–104.

Bibliografía

199. Alghasham A, Rasheed Z. Therapeutic targets for rheumatoid arthritis: Progress and promises. *Autoimmunity*. 2014;47(2):77–94.
200. Davies CA, Herrick AL, Cordingley L, Freemont AJ, Jeziorska M. Expression of advanced glycation end products and their receptor in skin from patients with systemic sclerosis with and without calcinosis. *Rheumatology*. 2009;48(8):876–82.
201. Allanore Y, Borderie D, Lemaréchal H, Ekindjian OG, Kahan A. Acute and sustained effects of dihydropyridine-type calcium channel antagonists on oxidative stress in systemic sclerosis. *Am J Med*. 2004;116(9):595–600.
202. Kaloudi O, Basta G, Perfetto F, Bartoli F, Del Rosso A, Miniati I, et al. Circulating levels of N ϵ -(carboxymethyl)lysine are increased in systemic sclerosis. *Rheumatology*. 2007;46(3):412–416.
203. Yoshizaki A, Komura K, Iwata Y, Ogawa F, Hara T, Muroi E, et al. Clinical Significance of Serum HMGB-1 and sRAGE Levels in Systemic Sclerosis: Association with Disease Severity. *J Clin Immunol*. 2008;29(2):180–189.
204. Dadoniene J, Cypiene A, Ryliskyte L, Ruginiene R, Ryliškiene K, Laucevičius A. Skin Autofluorescence in Systemic Sclerosis Is Related to the Disease and Vascular Damage: A Cross-Sectional Analytic Study of Comparative Groups. *Dis Markers*. 2015;2015:837470.
205. Kayhan S, Guzel A, Duran L, Tutuncu S, Guzel A, Gunaydin M, et al. Effects of leflunomide on inflammation and fibrosis in bleomycine induced pulmonary fibrosis in wistar albino rats. *J Thorac Dis*. 2013;5(5):641–649.
206. Jack CI, Jackson MJ, Johnston ID, Hind CR. Serum indicators of free radical activity in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153(6):1918–1923.
207. Zaaan MA, Zaki HF, El-Brairy AI, Kenawy SA. Pyrrolidinedithiocarbamate attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats: Modulation of oxidative stress, fibrosis, and inflammatory parameters. *Exp Lung Res*. 2016;1-9.
208. El-Khouly D, El-Bakly WM, Awad AS, El-Mesallamy HO, El-Demerdash E. Thymoquinone blocks lung injury and fibrosis by attenuating bleomycin-induced oxidative stress and activation of nuclear factor Kappa-B in rats. *Toxicology*. 2012;302(2):106-113.
209. Mizuguchi S, Takemura S, Minamiyama Y, Kodai S, Tsukioka T, Inoue K, et al. S-allyl cysteine attenuated CCl₄-induced oxidative stress and pulmonary fibrosis in rats. *Biofactors*. 2006;26(1):81–92.
210. Schamberger AC, Schiller HB, Fernandez IE, Sterclova M, Heinzelmann K, Hennen E, et al. Glutathione peroxidase 3 localizes to the epithelial lining fluid and the extracellular matrix in interstitial lung disease. *Sci Rep*. 2016; 6: 29952.
211. Bargagli E, Olivieri C, Bennett D, Prasse A, Muller-Quernheim J, Rottoli P. Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung diseases: A review. *Respir Med*. 2009;103(9):1245-1256.
212. Okuda R, Matsushima H, Oba T, Kawabe R, Matsubayashi M, Amano M, et al.

Bibliografía

- Efficacy and safety of inhaled N-acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis: A prospective, single-arm study. *Respir Investig*. 2016;54(3):156–161.
213. Martinez FJ, de Andrade JA, Anstrom KJ, King TE, Raghu G. Randomized trial of acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2014;370(22):2093–2101.
 214. Yildirim Z, Kotuk M, Iraz M, Kuku I, Ulu R, Armutcu F, et al. Attenuation of bleomycin-induced lung fibrosis by oral sulfhydryl containing antioxidants in rats: erdosteine and N-acetylcysteine. *Pulm Pharmacol Ther*. 2005;18(5):367–373.
 215. Westergren-Thorsson G, Hedström U, Nybom A, Tykesson E, Åhrman E, Hornfelt M, et al. Increased deposition of Glycosaminoglycans and altered structure of Heparan Sulfate in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016;83:27–38.
 216. Sandström J, Nilsson P, Karlsson K, Marklund SL. 10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *J Biol Chem*. 1994;269(29):19163–19166.
 217. Yamada H, Yamada Y, Adachi T, Goto H, Ogasawara N, Futenma A, et al. Polymorphism of extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) gene: relation to the mutation responsible for high EC-SOD level in serum. *Jpn J Hum Genet*. 1997;42(2):353–356.
 218. Rosas IO, Richards TJ, Konishi K, Zhang Y, Gibson K, Lokshin AE, et al. MMP1 and MMP7 as potential peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med*. 2008;5(4):93.
 219. Morais A, Beltrão M, Sokhatska O, Costa D, Melo N, Mota P, et al. Serum metalloproteinases 1 and 7 in the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis and other interstitial pneumonias. *Respir Med*. 2015;109(8):1063–1068.
 220. Chen J, Doyle TJ, Liu Y, Aggarwal R, Wang X, Shi Y, et al. Biomarkers of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(1):28–38.
 221. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;5(6):463–466.
 222. Gil L, Siems W, Mazurek B, Gross J, Schroeder P, Voss P, et al. Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free Radic Res*. 2006;40(5):495–505.
 223. Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Cheng D, et al. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23(14):1144–1170.
 224. Cai J, Han T, Nie C, Jia X, Liu Y, Zhu Z, et al. Biomarkers of oxidation stress, inflammation, necrosis and apoptosis are associated with hepatitis B-related acute-on-chronic liver failure. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2016;40(1):41–50.
 225. Altunoglu E, Guntas G, Erdenen F, Akkaya E, Topac I, Irmak H, et al. Ischemia-modified albumin and advanced oxidation protein products as

Bibliografía

- potential biomarkers of protein oxidation in Alzheimer's disease. *Geriatr Gerontol Int*. 2015;15(7):872–880.
226. Liang X, Chen Y, Zhuang J, Zhang M, Xiong W, Guo H, et al. Advanced oxidation protein products as prognostic biomarkers for recovery from acute kidney injury after coronary artery bypass grafting. *Biomarkers*. 2012;17(6):507–512.
227. Guilpain P, Chéreau C, Goulvestre C, Servettaz A, Montani D, Tamas N, et al. The oxidation induced by antimyeloperoxidase antibodies triggers fibrosis in microscopic polyangiitis. *Eur Respir J*. 2011;37(6):1503-1513.
228. Lee YS, Kim HC, Lee BY, Lee CK, Kim M-Y, Jang SJ, et al. The Value of Biomarkers as Predictors of Outcome in Patients with Rheumatoid Arthritis-Associated Usual Interstitial Pneumonia. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2016;33(3):216–223.

Bibliografía